

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年10月29日(29.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/131239 A1

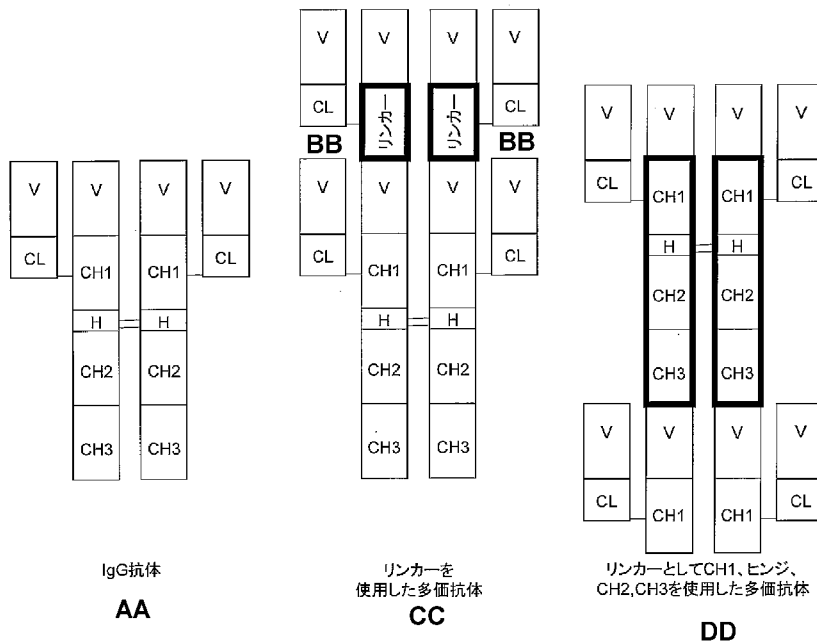
- (51) 国際特許分類:  
*C07K 16/46* (2006.01)    *C12N 5/10* (2006.01)  
*C12N 1/15* (2006.01)    *C12N 15/09* (2006.01)  
*C12N 1/19* (2006.01)    *C12P 21/00* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)    *C07K 16/28* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/058249
- (22) 国際出願日: 2009年4月27日(27.04.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-115463 2008年4月25日(25.04.2008) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者 (米国を除く全ての指定国について): 協和発酵キリン株式会社 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 高橋信明 (TAKAHASHI Nobuaki) [JP/JP]; 〒1948533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵キリン株式会社 抗体研究所内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,

[続葉有]

(54) Title: STABLE POLYVALENT ANTIBODY

(54) 発明の名称: 安定な多価抗体

[図1]



- AA IgG ANTIBODY  
BB LINKER  
CC POLYVALENT ANTIBODY UTILIZING LINKER  
DD POLYVALENT ANTIBODY UTILIZING CH1, HINGE, CH2 AND CH3

[続葉有]



WO 2009/131239 A1



KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(57) **Abstract:** Disclosed is a stable polyvalent antibody characterized by having multiple antibody heavy-chain variable regions linked to each other via a linker comprising an amino acid sequence for an immunoglobulin domain or a fragment thereof.

(57) 要約: この発明は、複数の抗体重鎖可変領域をイムノグロブリンドメインまたは該断片のアミノ酸配列を有するリンカーを介して結合していることを特徴とする安定な多価抗体に関する。

## 明 細 書

**発明の名称**： 安定な多価抗体

### 技術分野

[0001] 本発明は、複数の抗体重鎖可変領域（以下、VHと記す）がイムノグロブリンドメインまたはその断片を介して結合している多価抗体、該多価抗体のアミノ酸配列をコードするDNA、該DNAを含むベクター、多価抗体を発現する形質転換体および該形質転換体を用いて多価抗体を製造する方法に関する。

### 背景技術

[0002] イムノグロブリンは、すべての哺乳動物の血清や組織体液中に存在する糖蛋白質で、外来抗原を認識する働きをもっている（非特許文献1）。抗体は、補体系の活性化や、細胞表面に存在するレセプター（FcR）を介し、細胞の食作用、抗体依存性細胞障害作用、メディエーターの遊離作用、抗原提示作用などのエフェクター機能の活性化を介して、生体防御にかかわっている。ヒトのイムノグロブリンには、5つの異なったクラス、IgG、IgA、IgM、IgD、IgEが存在する。IgGはさらにIgG1、IgG2、IgG3、IgG4のサブクラスに、IgAは、IgA1、IgA2のサブクラスに分類することが出来る。イムノグロブリンの基本構造は、2本の相同な軽鎖（L鎖）と、2本の相同な重鎖（H鎖）から成り立っている。イムノグロブリンのクラスとサブクラスはH鎖によって決定される。それぞれのクラス、サブクラスのイムノグロブリンは異なった機能をもつことが解っている。たとえば、補体結合能は、IgM>IgG3>IgG1>IgG2の順で強い。また、Fcレセプターへの親和性は、IgG3>IgG1>IgG4>IgG2の順で高くなっている。プロテインAへは、IgG1、IgG2、IgG4が結合することができる。抗体は重鎖と軽鎖の組み合わせによって、結合する抗原が決定する。IgGの場合、1分子が2組の重鎖と軽鎖から構成され、抗体1分子当り2つの抗原結合部位を保有する。

[0003] 近年数多くのモノクローナル抗体に関して臨床試験が実施されており、上市されているモノクローナル抗体も数多くある（非特許文献2）。1986年に

マウス抗CD3抗体、muromonab-CD3がFDAから承認された。1994年には、抗原性を低減するために、抗体の定常領域をマウス型からヒト型に変換したキメラ抗体abciximabが承認を受けた。さらに抗原性を低減するためにヒト化技術が開発され、1997年には、可変領域をヒト化した、抗CD20ヒト化抗体、dacizumabが承認を受けた。2002年には、完全ヒト抗TNF抗体、adalimumabが承認された。

[0004] 抗体の活性を変化させることを目的として、様々な抗体の変異体を作る試みが行われてきた。例えば、異なる抗原を認識する複数の異なるポリペプチド鎖を重鎖や軽鎖として有する多価抗体が、ハイブリッドハイブリドーマにより作製されている。しかし、この方法を用いた場合、2種類の異なる重鎖、軽鎖を一つの細胞で発現することから、抗体の重鎖と軽鎖の組み合わせが10通り程度できる。このことから、結果として求める重鎖と軽鎖の組み合わせを正しく有する多価抗体の生産性が低下し、目的の多価抗体を単離精製することが難しい（非特許文献3）。

[0005] この問題点を克服するために、1つのポリペプチド鎖の中に複数の抗原認識部位を連結することにより、サブユニット間の組み合わせのバリエーションを減らし、正しいポリペプチドの組み合わせを有する抗体を生産する試みが報告されている。例えば、重鎖と軽鎖の抗原認識部位を1つのポリペプチドで連結したscFvを含有した抗体（非特許文献4）が知られている。さらに、抗体IgG1抗体のH鎖定常領域CH1ドメインあるいは該ドメインの部分断片、L鎖定常領域またはフレキシブルリンカー（Gly-Gly-Gly-Gly-Ser）を用いて、二つの抗原認識部位を連結させた抗体（非特許文献5、特許文献1、特許文献2）などが報告されている。

[0006] しかしながら、このような従来の多価抗体は、抗体タンパク質が凝集し易く、安定性や生産性が低いという欠点があった。

### 先行技術文献

### 非特許文献

[0007] 非特許文献1: Charles A. Janeway et. al. Immunobiology, 1997, Current

Biology Ltd/Garland Publishing Inc.

非特許文献2 : Emmanuelle Laffy et. al., Human Antibodies 14, 33-55, 2005

非特許文献3 : Suresh et. al., Methods Enzymol. 121, 210-228, 1986

非特許文献4 : Gruber et. Al., J. Immunol. 152, 5369, 1994

非特許文献5 : Wu et. Al., Nat. Biothech. 25, 1290-1297, 2007

非特許文献6 : Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition

非特許文献7 : Tomizuka. et al., Proc Natl Acad Sci USA., 2000 Vol 97:722

非特許文献8 : Yelton, D.E. et al. Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)

非特許文献9 : Kohler, G. et al. European J. Immunology, 6, 511-519 (1976)

非特許文献10 : Shulman, M. et al. Nature, 276, 269-270 (1978)

非特許文献11 : Kearney, J. F. et al. J. Immunology, 123, 1548-1550 (1979)

非特許文献12 : Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975)

非特許文献13 : P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY

非特許文献14 : P. Shepherd and C. Dean. Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS,

非特許文献15 : J. W. Goding. Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS

### 特許文献

[0008] 特許文献1 : US2007/0071675

特許文献2 : W02001/77342

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] 複数の抗原認識部位を有する多価抗体であって、安定性および生産性に優れた多価抗体が従来から求められてきた。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、1つの重鎖ポリペプチド中に複数の抗原認識部位を有する多価抗体において、抗原認識部位が互いに近接していない多価抗体の安定性が高く、かつ、生産性も良いことを見出した。

[0011] 本発明者らは、このような多価抗体が安定性や生産性に優れ、よって種々の医薬品や研究用試薬として有用であることを見出し、これらの知見に基づき本発明を完成させるに至った。

[0012] すなわち、本発明は、要約すると、以下の特徴を含む。

[0013] (1) 複数の抗体重鎖可変領域（以下、VHと記す）がイムノグロブリンドメインまたはその断片のアミノ酸配列を有するリンカーを介して結合していることを特徴とする多価抗体。

[0014] (2) イムノグロブリンドメインが、CH1、ヒンジ、CH2、および/またはCH3からなるイムノグロブリンドメインである、(1)記載の多価抗体。

[0015] (3) イムノグロブリンドメインが、CH1またはCH1断片である、(2)記載の多価抗体。

[0016] (4) CH1断片が、14番目がシステイン（Cys）である14アミノ酸からなるCH1断片である、(3)記載の多価抗体。

[0017] (5) CH1断片が、IgD、IgM、IgG、IgAおよびIgEの抗体サブクラスから選ばれるCH1のアミノ酸配列のN末端から1番目～14番目のアミノ酸配列である、(4)記載の多価抗体。

[0018] (6) CH1断片のアミノ酸配列が、配列番号311および配列番号334～配列番号361から選ばれるいずれか1つのアミノ酸配列である、(5)記載の多価抗体。

- [0019] (7) CH1断片のアミノ酸配列が、配列番号362～配列番号375から選ばれるいずれか1つのアミノ酸配列である、(3)記載の多価抗体。
- [0020] (8) 同一の軽鎖を含む、(1)～(7)のいずれかに記載の多価抗体。
- [0021] (9) (1)～(8)のいずれかに記載の多価抗体のアミノ酸配列をコードするDNA。
- [0022] (10) (9)記載のDNAを含む組換えベクター。
- [0023] (11) (10)に記載の組換えベクターが導入された形質転換体。
- [0024] (12) (11)に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に(1)～(8)のいずれかに記載の多価抗体を生成蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする(1)～(8)のいずれかに記載の多価抗体の製造方法。

### 発明の効果

- [0025] 本発明に係る多価抗体は、安定性に優れ、生産性が良い。本発明に係る多価抗体はまた、種々の疾患に対する治療薬や診断薬として使用できる。さらに本発明に係る多価抗体は安定な研究用試薬としても使用できる。
- [0026] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2008-115463号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

### 図面の簡単な説明

- [0027] [図1]本発明の多価抗体の構造を示す図である。太線の枠は、リンカー構造を表わす。

### 発明を実施するための形態

- [0028] 本明細書中で使用される用語は、以下の定義を含むものとする。
- [0029] 「抗体」とは、イムノグロブリンを構成する重鎖の可変領域及び重鎖の定常領域、並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域、の全部または一部をコードする遺伝子（「抗体遺伝子」と総称する）に由来するものである。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びサブクラスを有する抗体をも包含する。
- [0030] 「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の配列を有する抗体を意味し、

例えばヒトB細胞ハイブリドーマ、ヒト化SCIDマウス、ヒト抗体遺伝子発現マウス、ヒト抗体遺伝子ライブラリーからPhage Display、Yeast Display等の技術により取得することができる。ヒト化抗体とは、ヒト以外の動物から取得された抗体の配列の一部をヒト抗体の配列に置換した抗体を示す (Emmanuelle Laffy et. al., Human Antibodies 14, 33-55, 2005)。

[0031] 「重鎖」とは、イムノグロブリン分子を構成する2種類のポリペプチド (H鎖、L鎖) のうち、分子量が大きいほうのポリペプチドのことを示す。抗体のクラスとサブクラスを決定する。IgG1, IgG2, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD, IgEはそれぞれ、重鎖の定常領域として異なったアミノ酸配列を有する。

[0032] 「軽鎖」とは、イムノグロブリン分子を構成する2種類のポリペプチド (H鎖、L鎖) のうち、分子量が小さいほうのポリペプチドのことを示す。ヒトの抗体の場合カッパとラムダの2種類が存在する。

[0033] 「可変領域」 (variable region: V領域とも呼ばれる。) とは、通常イムノグロブリンのN末側にあるアミノ酸配列の多様性に富んだ領域を示す。それ以外の部分は多様性の少ない構造をしているので「定常領域」 (constant region: C領域とも呼ばれる。) と呼ばれる。重鎖と軽鎖の可変領域は複合体を形成し、抗体の抗原への特性を決定する。ヒトの抗体の重鎖ではKabatらのEUインデックス (Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition) における1番目から117番目までが可変領域であり、118番目のアミノ酸から定常領域が始まる。ヒトの抗体の軽鎖ではKabatらのEUインデックスにおける1番目から107番目までが可変領域であり、108番目のアミノ酸から定常領域が始まる。また、以下において、重鎖可変領域または軽鎖可変領域を、VHまたはVLと略記する。

[0034] 「抗原認識部位」とは、抗原を認識する部位であり、抗原決定基 (エピトープ) と相補的な立体構造を形成する部位を示す。抗原認識部位は抗原決定基と強い分子間相互作用を起こすことができる。抗原認識部位は少なくとも3つの相補性決定領域 (complementary determining region: CDR略す。) を含む重鎖可変領域 (VH) または軽鎖可変領域 (VL) があげられる。ヒトの抗

体の場合、重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ3つの相補性決定領域（CDR）を有し、抗原認識部位を含む。これらのCDRは、それぞれN末側から順番にCDR1、CDR2、CDR3と呼ばれる。

- [0035] 「多価抗体」とは、重鎖および/または軽鎖に抗原認識部位を少なくとも2つ以上有する抗体を示す。それぞれの抗原認識部位は同一の抗原決定基を認識してもいいし、異なる抗原決定基を認識してもいい。
- [0036] 本発明の多価抗体は、複数の抗体重鎖可変領域がイムノグロブリンドメイン又はその断片を介して結合している多価抗体である。
- [0037] 本発明の多価抗体として具体的には、(a) 1つの重鎖ポリペプチドに複数（例えば2～5個）の異なる抗原認識部位を含み、抗原認識部位は互いに離間して近接していないこと、(b) 抗原認識部位は10アミノ酸以上、好ましくは50アミノ酸以上、より好ましくは50～500アミノ酸のポリペプチドリンカーを介してタンDEM（縦列）に連結されていること、具体的には、抗原認識部位は、例えばイムノグロブリンドメインの全部又は一部のアミノ酸配列を有するリンカーを用いて連結されていること、(c) 軽鎖の抗原認識部位が対応する重鎖の抗原認識部位と複合体を形成していること、(d) 図1に示されるように2本の重鎖ポリペプチドと少なくとも4本の軽鎖ポリペプチドからなる抗体構造を有すること、並びに、2本の重鎖ポリペプチド間は、ヒンジ領域でジスルフィド結合で連結され、軽鎖ポリペプチドと重鎖ポリペプチド間もジスルフィド結合で連結されていること、或いは、(e) 重鎖の定常領域は、例えば天然型抗体重鎖の定常領域の全部又は一部（例えば、CH1断片、CH1、CH2、CH3、CH1-ヒンジ、CH1-ヒンジ-CH2、CH1-ヒンジ-CH2-CH3など）からなること、などを含む。
- [0038] さらに具体的には、図1に多価抗体の構造例とともに、リンカー構造が示されている。
- [0039] 「イムノグロブリンドメイン」とは、イムノグロブリンと類似のアミノ酸配列を持ち、少なくとも2個のシステイン残基が存在する約100個のアミノ酸残基からなるペプチドを示す。イムノグロブリンドメインとしては、イムノ

グロブリン重鎖のVH、CH1、CH2およびCH3や、イムノグロブリン軽鎖のVLおよびCLなどがあげられる。また、イムノグロブリンドメインはイムノグロブリン以外のタンパク質にも存在し、例えば主要組織適合抗原(MHC)、CD1、B7、T細胞受容体(TCR)などのイムノグロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質に含まれているイムノグロブリンドメインがあげられる。本発明の多価抗体に用いられるイムノグロブリンドメインとしては、いずれのイムノグロブリンドメインも使用可能である。

- [0040] 単一の抗原を認識する抗体をモノクローナル抗体という。
- [0041] モノクローナル抗体とは、単一クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体であり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（1次構造）が均一である。
- [0042] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などがあげられる。
- [0043] CH1とCH2の間には「ヒンジ（蝶番）領域」と呼ばれる柔軟性に富んだアミノ酸領域が存在する。
- [0044] ヒトの抗体の場合、CH1はEUインデックス118番目から215番目のアミノ酸配列を有する領域を示す。同様にヒンジ領域はEUインデックス216番目から230番目、CH2はEUインデックス231番目から340番目、CH3はEUインデックス341番目から446番目のアミノ酸配列を有する領域を示す。
- [0045] 「CL」は軽鎖の定常領域を示す。ヒトの抗体のカッパ鎖の場合、KabatらのEUインデックス108番目から214番目、ラムダ鎖の場合、108番目から215番目のアミノ酸配列を有する領域を示す。
- [0046] 「リンカー」とは、2つの抗原認識部位をつなぐ化学構造を示す。望ましくはポリペプチドを意味する。
- [0047] 本発明の多価抗体に用いられるリンカーとしては、イムノグロブリンドメインの全部又は一部のアミノ酸配列を有するリンカーや、複数のイムノグロブリンドメインからなるリンカーの全部又は一部のアミノ酸配列を有するリ

ンカーが望ましい。

- [0048] イムノグロブリンドメインから選ばれるアミノ酸配列は断続的でも連続的でも良いが、好ましくは連続するアミノ酸配列が良い。本発明において、望むべきリンカーとしては、10アミノ酸以上の長さを有したポリペプチド、好ましくは14アミノ酸以上、さらに望ましくは50アミノ酸以上、例えば50アミノ酸以上500アミノ酸以下の長さのポリペプチドを示す。
- [0049] 本発明において、リンカーの1つの例として抗体のCH1、ヒンジ、CH2およびCH3からなるアミノ酸配列の、全部又は一部の断片を適宜組み合わせ用いることができる。また、それらのアミノ酸配列を部分的に欠損させたり、順番を入れ替えて使用することもできる。
- [0050] 本発明の多価抗体に用いられるイムノグロブリンドメインおよびその断片としては、(N末端からC末端への向きで)、非限定的に、CH1-ヒンジ-CH2-CH3からなるイムノグロブリンドメイン、CH1-ヒンジ-CH2からなるイムノグロブリンドメイン、CH1-ヒンジからなるイムノグロブリンドメイン、CH1からなるイムノグロブリンドメイン、CH1のN末端側の断片、CH1の14番目のアミノ酸がCysである14アミノ酸残基からなるCH1断片、CH1のN末端側から14アミノ酸残基からなるCH1断片、およびこれらイムノグロブリンドメイン断片のアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸残基が改変されたものをあげることができる。
- [0051] イムノグロブリンドメインおよびその断片は、イムノグロブリンサブクラスIgD、IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA1およびIgEのいずれのサブクラス由来のものでもよく、好ましくは、IgG、IgM由来があげられる。
- [0052] 本発明において、イムノグロブリンドメインおよび該断片としてより具体的には、配列番号99に示されるCH1、ヒンジ、CH2およびCH3からなるイムノグロブリンドメイン、配列番号99の1~219番目のアミノ酸配列で示されるCH1、ヒンジおよびCH2からなるイムノグロブリンドメイン、配列番号99の1~94番目のアミノ酸配列で示されるCH1およびヒンジからなるイムノグロブリンドメインおよび配列番号77に示されるCH1からなるイムノグロブリンドメインをあ

げることができる。

[0053] また、本発明において、CH1断片としては、配列番号362～375に示されるCH1断片、CH1の14番目のアミノ酸がCysである14アミノ酸残基からなるCH1断片またはCH1のN末端側14アミノ酸残基からなるCH1断片をあげることができ、より具体的には、配列番号311および配列番号334～361をあげることができる。

[0054] 本発明の多価抗体としては、上述のイムノグロブリンドメインまたはその断片を用いて結合させた2つ以上の重鎖可変領域を有する多価抗体があげられる。3つ以上の重鎖可変領域を結合させる場合には、異なるイムノグロブリンドメインまたはその断片を用いても良い、同じイムノグロブリンドメインまたはその断片を用いることもできる。また、2つ以上の重鎖可変領域を連結させる場合には、各VHが特異的抗原に結合可能なようにイムノグロブリンドメインまたはその断片の長さや種類を変えることができる。

[0055] 本発明において、多価抗体に含まれる軽鎖可変領域は、同一の軽鎖可変領域であっても、異なる軽鎖可変領域であってもいずれでもよい。同一の軽鎖可変領域を有する2つ以上の抗原に結合することができる多価抗体の重鎖可変領域は、各抗体可変領域がそれぞれ特異的な抗原に結合できるように、ファージディスプレイなどの方法を用いて適切な重鎖可変領域を選択することができる。

[0056] 本発明において多価抗体が結合する抗原としては、以下のものに限定されないが、例えば、癌、自己免疫疾患、アレルギー疾患等の異常な細胞増殖を伴う疾患に関連した抗原、臓器再生や組織再生に関与する抗原などの抗原が挙げられ、本発明の多価抗体は、それら2つ以上の異なる抗原またはエピトープに結合することができる。すなわち、本発明の多価抗体は、異なる2つの抗原に結合することもできるし、1つの抗原上に存在する異なる2つのエピトープに結合することもできる。また、本発明の多価抗体は、抗原に結合して該抗原を活性化することも、不活性化することもできることから、標的とする疾患に合わせた抗原を選択することができる。以下に、本発明の多価抗体の標的となり得る抗原を例示するが、これに限定されない。

- [0057] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、Cluster of differentiation(以下、CDと記載する)19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80(B7.1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86(B7.2)、human leukocyte antigen(HLA)-Class II、またはEpidermal Growth Factor Receptor(EGFR)などがあげられる。
- [0058] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子(CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、またはB7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド(CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、またはBTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor(TNF)受容体ファミリー分子(DR4、DR5、TNFR1、またはTNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor(TRAIL)ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー(TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、またはTRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand(RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン[IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor(TGF) $\beta$ 、またはTNF $\alpha$ など]、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン(SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、またはCTACKなど)、またはこれらのケモカインの受容体、およびvascular endothelial growth factor(VEGF)、Angiopoietin、fibroblast growth factor(FGF)、EGF、platelet-derived growth factor(PDGF)、insulin-like growth factor(IGF)、hepatocyte growth factor(HGF)、erythropoietin(EPO)、TGF $\beta$ 、IL-8、Ephilin、SDF-1、またはこれらの受容体があげられる。
- [0059] 異常組織の血管新生に関与する抗原、または臓器再生および組織再生に関与する抗原としては、VEGF、Angiopoietin、FGF、EGF、PDGF、IGF、HGF、EPO、TGF $\beta$ 、IL-8、Ephilin、SDF-1、またはこれらの受容体などがあげられる。
- [0060] 本発明において、多価抗体のエフェクター活性は、以下のようにして制御することができる。

- [0061] 抗体のFc領域（CH2およびCH3ドメインからなる定常領域）の297番目のアスパラギン（Asn）に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に $\alpha$ -1,6結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（W02005/035586、W02002/31140、W000/61739）や、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明の多価抗体はいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。
- [0062] エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）、補体依存性傷害活性（CDC活性）や、マクロファージや樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Antibody-dependent phagocytosis, ADP活性）などが知られている。
- [0063] 多価抗体のFcのN結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、多価抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、 $\alpha$ 1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて多価抗体を発現することで、フコースが結合していない多価抗体を取得することができる。フコースが結合していない多価抗体は高いADCC活性を有する。一方、多価抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、 $\alpha$ 1,6-フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している多価抗体を取得できる。フコースが結合している多価抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いADCC活性を有する。
- [0064] また、多価抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性やCDC活性を増加または低下させることができる。例えば、US2007/0148165に記載のFc領域のアミノ酸配列を用いることで、多価抗体のCDC活性を増加させることができる。また、US6,737,056、US7,297,775、やUS7,317,091に記載のアミノ酸改変を行うことで、ADCC活性またはCDC活性を、増加させることも低下さ

せることもできる。

- [0065] 更に、上述の方法を組み合わせ、一つの多価抗体に使用することにより、多価抗体のエフェクター活性が制御された多価抗体を取得することができる。
- [0066] 本発明に多価抗体をコードするDNA配列において、重鎖可変領域とリンカーの間に制限酵素部位を導入することによって、重鎖可変領域とリンカーの配列を様々に変更することが容易になる。
- [0067] 本発明の多価抗体の安定性は、精製過程や一定条件下で保存されたサンプルにおいて形成される凝集体（オリゴマー）量を測定することによって評価できる。すなわち、同一条件で凝集体量が低減する場合、抗体の安定性が向上したとする。凝集体量は、ゲルろ過クロマトグラフィーを含む適当なクロマトグラフィーを用いて凝集した抗体と凝集していない抗体を分離することによって測定することができる。凝集体量を測定する方法は、実施例18に例示されている。
- [0068] 本発明の多価抗体の生産性は、抗体産生細胞から培養液中に産生される抗体量を測定することによって評価できる。より具体的には、培養液から産生細胞を除いた培養上清に含まれる抗体の量をHPLC法やELISA法などの適当な方法で測定することによって評価できる。生産性を測定する方法は、実施例17に例示されている。
- [0069] 本発明の抗体については、使用する対象動物や目的に応じて、重鎖及び軽鎖の可変領域及び定常領域としていかなる動物に由来するものを使用するかを決定することができる。例えば、対象動物がヒトの場合には、可変領域は、例えばヒト又はマウス由来とし、定常領域をヒト由来とし、及びリンカーはヒト由来とすることができる。
- [0070] 本明細書において「動物」は、通常、ヒト、サル、チンパンジー、マウス、ラット、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ラクダ、トリ等を含む哺乳動物を指す。
- [0071] 本発明の抗体の具体例が後述の実施例に記載されるが、本発明の抗体には

、抗体の誘導体も包含される。誘導体には、例えば1～約30個、好ましくは1もしくは数個（例えば、1～10個、好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～3個）のアミノ酸の置換、欠失、付加及び/又は挿入が含まれる。アミノ酸置換の例は、保存的アミノ酸置換であり、この置換は、電荷、極性（もしくは疎水性）又は側鎖の構造が類似したアミノ酸間の置換を意味し、例えば塩基性アミノ酸（Lys, Arg, His）、酸性アミノ酸（Asp, Glu）、無電荷極性アミノ酸（Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, Cys）、無極性アミノ酸（Ala, Val, Leu, Ile, Pro）、芳香族アミノ酸（Phe, Trp, Tyr, His）などに分けることができる。

[0072] さらに、本発明の抗体は、化学修飾されていてもよい。このような修飾には、ペグ化、アセチル化、アミド化、リン酸化、グリコシル化などが含まれ、一般に、修飾は、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基などの官能基を介して行うことができる。或いは、本発明の抗体は、医薬又は診断用物質とコンジュゲートしてもよい。医薬又は診断用物質は、特に限定されず、例えばペプチド、ポリペプチド、核酸、小分子、無機元素、無機分子、有機分子などを含む。医薬物質は、生体内の標的部位で治療効能を発揮する物質であり、例えば抗癌剤、抗ウイルス剤などが挙げられる。診断用物質は、例えば放射性同位元素を含む。コンジュゲーションには、共有結合、非共有結合、ビオチン/アビジン（又はストレプトアビジン）系などを利用することができる。或いは、本発明の抗体は、固相（例えば樹脂、プラスチック、紙、金属など）、例えばプレート、ビーズ、テストストリップ、アレイなどに固定されていてもよい。

[0073] 以下、多価抗体の作製法を詳述するが、該抗体の作製法はこれに限定されない。

[0074] (1) モノクローナル抗体の作製方法

本発明において、抗体の製造にあたっては、下記の作業工程を包含する。

[0075] すなわち、(1)免疫原として使用する抗原の精製及び/又は抗原を細胞表面に過剰に発現している細胞の作製、(2)抗原を動物に免疫した後、血液を採取

しその抗体価を検定して脾臓等の摘出の時期を決定し、抗体産生細胞を調製する工程、(3) 骨髄腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、(4) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合によるハイブリドーマの作製、(5) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、(6) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、等である。

[0076] 以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。また動物血清由来の抗体を用いることも可能である。

[0077] (1-1) 抗原の精製

タンパク質の抗原としては、抗原タンパク質をそのまま利用してもいいし、抗原タンパク質を適当な他のポリペプチドと融合した融合タンパク質として利用してもいい。例えば、抗原タンパク質の細胞外領域とヒトIgGのFc領域、もしくはグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質を用いることができる。抗原の細胞外領域とヒトIgGの定常領域、もしくはGSTとの融合タンパク質をコードするDNAを動物細胞用発現ベクターに組み込み、該発現ベクターを動物細胞に導入し、取得した形質転換株の培養上清から精製することにより取得できる。また、ヒト細胞株の細胞膜上に存在する抗原そのものを精製したのも、抗原として使用することができる。

[0078] (1-2) 抗体産生細胞の調製工程

(1-1) で得られた抗原と、フロインドの完全若しくは不完全アジュバント、又はカリミョウバンのような助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。実験動物としては例えばマウスを使用できる。ヒト由来の抗体を産生する能力を有するトランスジェニックマウスが最も好適に用いられるが、そのようなマウスは富塚らの文献（Tomizuka, et al., Proc Natl Acad Sci US A, 2000 Vol 97:722）に記載されている。

[0079] マウス免疫の際の免疫原投与方法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射、足蹠注射などいずれでもよいが、腹腔内注射、足蹠

注射又は静脈内注射が好ましい。

- [0080] 免疫は、一回、又は、適当な間隔で（好ましくは3日間から1週間間隔で）複数回繰返し行なうことができる。その後、免疫した動物の血清中の抗原に対する抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給原として用いれば、以後の操作の効果を高めることができる。一般的には、最終免疫後3～5日後の動物由来の抗体産生細胞を、後の細胞融合に用いることが好ましい。
- [0081] ここで用いられる抗体価の測定法としては、放射性同位元素免疫定量法（以下「RIA法」という）、固相酵素免疫定量法（以下「ELISA法」という）、蛍光抗体法、受身血球凝集反応法など種々の公知技術が利用できる。
- [0082] 本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載するような手順により行うことができる。まず、精製又は部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係なタンパク質、例えばウシ血清アルブミン（以下「BSA」という）により覆い、該表面を洗浄後、一次抗体として段階希釈した試料（例えばマウス血清）に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。さらに二次抗体として酵素標識されたヒト抗体に対する抗体を加えてヒト抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することにより、抗体価を算出する。
- [0083] (1-3) ミエローマの調製工程

ミエローマとしては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物に由来する自己抗体産生能のない細胞を用いることが出来る。一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）ミエローマ株P3X63Ag8U.1(P3-U1) (Yelton, D. E. et al. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 81, 1-7 (1978) )、P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1) (Kohler, G. et al. *European J. Immunology*, 6, 511-519 (1976) )、Sp2/0-Ag14(SP-2) (Shulman, M. et al. *Nature*, 276, 269-270 (1978) )、P3X63Ag8.653(653) (Kearney, J. F. et al. *J. Imm*

unology, 123, 1548-1550 (1979) )、P3X63Ag8(X63) (Horibata, K. and Harris, A. W. Nature, 256, 495-497 (1975) ) などを用いることが好ましい。これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地 [グルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清 (以下「FCS」という) を加えたRPMI-1640培地に8-アザグアニンを加えた培地]、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 以下「IMDM」という)、又はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 以下「DMEM」という) で継代培養するが、細胞融合の3~4日前に正常培地 (例えば、10% FCSを含むDMEM培地) で継代培養し、融合当日に $2 \times 10^7$ 以上の細胞数を確保しておく。

[0084] (1-4)細胞融合

抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体のいずれの部位から得てもよく、一般には脾、リンパ節、骨髄、扁桃、末梢血、又はこれらを適宜組み合わせたもの等から得ることができるが、脾細胞が最も一般的に用いられる。

[0085] 最終免疫後、所定の抗体価が得られた実験動物 (例えばマウス) から抗体産生細胞が存在する部位、例えば脾臓を摘出し、抗体産生細胞である脾細胞を調製する。この脾細胞と工程(3)で得られたミエローマを融合させる手段として現在最も一般的に行われているのは、細胞毒性が比較的少なく融合操作も簡単な、ポリエチレングリコールを用いる方法である。この方法は、例えば以下の手順よりなる。

[0086] 脾細胞とミエローマとを無血清培地 (例えばDMEM)、又はリン酸緩衝生理食塩液 (以下「リン酸緩衝液」という) でよく洗浄し、脾細胞とミエローマの細胞数の比が5:1~10:1程度になるように混合し、遠心分離する。上清を除去し、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら1mlの50% (w/v) ポリエチレングリコール (分子量1000~4000) を含む無血清培地を滴下する。その後、10mlの無血清培地をゆっくりと加えた後遠心分離する。再び上清を捨て、沈澱した細胞を適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (以

下「HAT」という)液及びヒトインターロイキン-2(以下「IL-2」という)を含む正常培地(以下「HAT培地」という)中に懸濁して培養用プレート(以下「プレート」という)の各ウェルに分注し、5%炭酸ガス存在下、37°Cで2週間程度培養する。途中適宜HAT培地を補う。

[0087] (1-5)ハイブリドーマ群の選択

上記ミエローマ細胞が、8-アザグアニン耐性株である場合、すなわち、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)欠損株である場合、融合しなかった該ミエローマ細胞、及びミエローマ細胞どうしの融合細胞は、HAT含有培地中では生存できない。従って、HAT含有培地中での培養を続けることによって、ハイブリドーマを選択することができる。

[0088] コロニー状に生育してきたハイブリドーマについて、HAT培地からアミノプテリンを除いた培地(以下「HT培地」という)への培地交換を行う。以後、培養上清の一部を採取し、例えば、ELISA法により抗体価を測定する。

[0089] 以上、8-アザグアニン耐性の細胞株を用いる方法を例示したが、その他の細胞株もハイブリドーマの選択方法に応じて使用することができる。

[0090] (2)多価抗体の作製方法

本発明において、多価抗体は例えば上記のようにして得られたハイブリドーマから発現される、異なるエピトープに対する複数のモノクローナル抗体の遺伝子をクローニングし、その抗原認識部位を決定し、得られた抗原認識部位を含む多価抗体の遺伝子を設計することによって作製することができる。より具体的には、得られた抗原認識部位とリンカーを適宜組み合わせた多価抗体のDNAを合成し、発現プラスミドに組み込む。

[0091] ここで、リンカーは、抗原認識部位と別の抗原認識部位との間を連結するものであり、通常、10アミノ酸以上のポリペプチドからなり、好ましくは50アミノ酸以上、より好ましくは50アミノ酸~500アミノ酸を有する。本発明の実施形態において、より好ましいリンカーは、図1に示されるような、ヒト抗体重鎖定常領域のCH1からなるリンカー又はCH1を含むリンカー、例えばCH1-ヒンジ-CH2-CH3からなるリンカーである。具体的には、前者のリンカーは配

列番号77、後者のリンカーは配列番号99に示されるアミノ酸配列を有する。

[0092] また、発現プラスミドの例は、pTracer-CMV/Bsd, pTracer-EF/Bsd, pTracer-SV40 (Invitrogen社) 等があげられる。

[0093] 発現プラスミドを適宜な産生細胞（例えばCHO細胞などの動物細胞）に導入し、得られた形質転換細胞を多価抗体産生細胞として培養し、その培養液から多価抗体を精製することができる。以下に多価抗体の作製方法を詳述するが、多価抗体の作製法は以下の記述に限定されるものではない。例えば、発現プラスミドを動物中で発現させて動物の血清やミルク中に発現する方法や、ポリペプチドを化学合成して多価抗体を作製する方法などがその他の多価抗体の作製法として考えられる。

[0094] (2-1)ハイブリドーマのクローニング

(1-2)の記載と同様の方法で抗体価を測定することにより、特異的抗体を産生することが判明したハイブリドーマを、別のプレートに移しクローニングを行う。このクローニング法としては、プレートの1ウェルに1個のハイブリドーマが含まれるように希釈して培養する限界希釈法、軟寒天培地中で培養しコロニーを回収する軟寒天法、マイクロマニピレーターによって1個ずつの細胞を取り出し培養する方法、セルソーターによって1個の細胞を分離する「ソータクロン」などが挙げられるが、限界希釈法が簡便であり、よく用いられる。

[0095] 抗体価の認められたウェルについて、例えば限界希釈法によるクローニングを2~4回繰返し、安定して抗体価が認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

[0096] (2-2) 抗体産生細胞の作製

各抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマ等の抗体産生細胞から抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子をクローニングする。単一の軽鎖を使用して多価抗体を作製する場合には、多価抗体に含まれる抗体可変領域が特異的抗原に反応するように、ファージディスプレイ法等のスクリーニングを行い、単一の軽鎖に最適化した抗体重鎖を選択する。選択した重鎖の可変領

域をコードするDNA配列を、本発明の多価抗体に用いられているイムノグロブリンドメインまたは該断片のリンカー配列と連結させて、多価抗体重鎖をコードするDNA配列を作製する。作製した多価抗体重鎖をコードするDNA配列と単一の軽鎖をコードするDNA配列を、適当なタンパク質発現ベクターに挿入して、多価抗体発現ベクターを作製する。一方、各抗原ごとに異なる複数の軽鎖を利用する場合には、複数の抗体重鎖可変領域をコードするDNA配列を、本発明の多価抗体に用いられているイムノグロブリンドメインまたは該断片のリンカー配列と連結させて、多価抗体重鎖をコードするDNA配列を作製する。多価抗体の重鎖および軽鎖をコードするDNAは、単一の発現ベクターに挿入してタンデム型の多価抗体発現ベクターとしてもよいし、別々の発現ベクターに挿入して、セパレート型の多価抗体発現ベクターとしてもよい。次に作製した多価抗体発現ベクターを、宿主（例えば哺乳類細胞、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など）に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を調製することができる（P. J. Delves, ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES, 1997 WILEY; P. Shepherd and G. Dean. Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J. W. Goding. Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 ACADEMIC PRESS）。

[0097] ベクターには、宿主で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミド、ウイルス、人工染色体などが使用される。プラスミドDNAとしては、例えば大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしては、例えばλファージ、T7ファージ、M13ファージなどが挙げられる。ウイルスベクターとしては、例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスなどが挙げられる。人工染色体としては、例えばヒト人工染色体(HAC)を含む哺乳類人工染色体(MAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC, PAC)などが挙げられる。

[0098] 形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞などが挙げられる。

- [0099] 宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、動物に遺伝子を導入する方法としては、胚性幹(ES)細胞、人工多能性幹(iPS)細胞などの分化多能性細胞にマイクロセル法、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法などの手法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。この場合、分化多能性細胞を胚盤胞に導入し、仮親の子宮に移植することによってトランスジェニック動物を作出することが可能である。
- [0100] それゆえ、本発明の多価抗体をコードする遺伝子を含む形質転換体は、細胞だけでなく動物も包含する。
- [0101] 多価抗体の作製の場合は、複数の抗原認識部位とリンカーを適宜組み合わせた多価抗体をコードする遺伝子を合成し、その遺伝子を適当な発現プラスミドに組み込むことができる。抗原認識部位の取得のためには、上述のハイブリドーマを用いた方法のほかに、Phage Display法のほか、Yeast display等の技術により適当な抗原認識部位を決定、単離して、取得することが出来る(Emmanuelle Laffy et. al., Human Antibodies 14, 33-55, 2005)。
- [0102] (2-3) 多価抗体の発現と精製
- 本発明において、多価抗体は、形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、(a)培養上清、(b)培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物、(c)形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。
- [0103] 培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜

組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

[0104] (3) 抗原認識部位の決定方法

モノクローナル抗体の認識エピトープの同定は以下のようにして行なうことができる。まず、モノクローナル抗体の認識する分子の様々な部分構造を作製する。部分構造の作製にあたっては、公知のオリゴペプチド合成技術を用いてその分子の様々な部分ペプチドを作成する方法、遺伝子組換え技術を用いて目的の部分ペプチドをコードするDNA配列を好適な発現プラスミドに組み込み、大腸菌等の宿主内外で生産する方法等があるが、上記目的のためには両者を組み合わせて用いるのが一般的である。例えば、抗原タンパク質のC末端又はN末端から適当な長さで順次短くした一連のポリペプチドを当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製した後、それらに対するモノクローナル抗体の反応性を検討し、大まかな認識部位を決定する。

[0105] その後、さらに細かく、その対応部分のオリゴペプチド、又は該ペプチドの変異体等を、当業者に周知のオリゴペプチド合成技術を用いて種々合成し、本発明の予防又は治療剤が有効成分として含有するモノクローナル抗体のそれらペプチドに対する結合性を調べるか、又は該モノクローナル抗体と抗原との結合に対するペプチドの競合阻害活性を調べることによりエピトープを限定する。多種のオリゴペプチドを得るための簡便な方法として、市販のキット（例えば、SPOTsキット（ジェノシス・バイオテクノロジーズ社製）、マルチピン合成法を用いた一連のマルチピン・ペプチド合成キット（カイロン社製）等）を利用することもできる。

[0106] (4) 抗原結合実験方法

本発明において、抗原への抗体の結合実験は、実施例19に記載の可溶性抗原を用いたELISAによる測定その他、抗原発現細胞を用いたフローサイトメトリーによる解析、可溶性抗原を用いた表面プラズモン共鳴を利用した検出法により測定する。

## 実施例

- [0107] 以下に多価抗体の実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明がこれらの実施例に限定されるものでないことは言うまでもない。
- [0108] また、ヒト、マウスを含む動物の抗体及びその遺伝子の配列は、例えばGen Bankなどの遺伝子バンクに登録されたものを利用することができる。
- [0109] [実施例 1] 第1の抗原認識部位の取得
- 第1の抗原認識部位を取得するために、W002/088186に記載の抗CD40抗体を用いた。具体的にはハイブリドーマKM341-1-19(寄託番号BP-7759)が産生する抗体(以下341-1-19と略す)の軽鎖および重鎖を用いた。ハイブリドーマKM341-1-19は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1-1-1中央第6、郵便番号305-8566)に寄託されている。
- [0110] 341-1-19抗体の重鎖全長DNA配列(配列番号1)、アミノ酸配列(配列番号2)及び軽鎖可変領域をコードするDNA配列(配列番号3)およびアミノ酸配列(配列番号4)をそれぞれ配列表に示す。
- [0111] 重鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号1の5'末端から50番目のアデニン(A)からはじまるATGコドンであり、終止コドンは1472番目のチミン(T)からはじまるTGAである。抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から493番目のアデニン(A)と494番目のグアニン(G)間に位置する。重鎖アミノ酸配列において、H鎖可変領域は配列番号2のN末端から148番目のセリン(S)残基までであり、149番目のアラニン(A)以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア(Signal P ver. 2)により、H鎖のシグナル配列は配列番号2のN末端より20番目のセリン(S)までと予測された。成熟体のN末端は配列番号2の21番目のグルタミン(Q)であるものと考えられる。
- [0112] 軽鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号3の5'末端から29番目のAからはじまるATGコドンであり、可変領域は5'末端から400番目のアデニン(A)までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号4のN末端から124番目のリジン(K)までである。精製されたL鎖蛋白質のN末端分析により、L鎖のシグナル配列は配列番号4のN末端より20番目のグリシン(G)までであり、成熟体のN末端は配列番号4の21番目のグルタミン酸(E)であることが明らかとなっ

た。

[0113] [実施例 2] 第2の抗原認識部位の取得のための免疫

第2の抗原認識部位を取得するために抗ヒトCD28抗体の取得を行った。

[0114] 抗CD28 抗体の取得のための免疫は、上述の抗CD40抗体を取得した方法W002/088186に順じて行った。マウスにRecombinant Human CD28 / Fc Chimera (R&D SYSTEM社製) を、MPL+TDM EMULSION (RiBi, シグマ社製) と1 : 1で混合し、40  $\mu$ g/匹で右腹腔内に免疫した。免疫は、14日間毎に3回行った。さらに脾臓を取得する3日前に同抗原を免疫した。

[0115] [実施例 3] 抗CD40抗体の軽鎖と共通の軽鎖を有する抗CD28抗体のscFVライブラリーの作製

実施例1の抗CD40抗体341-1-19の軽鎖と共通の軽鎖を有する抗CD28抗体をスクリーニングするために、実施例2で作製されたCD28で免疫されたマウスの脾臓を用いて、抗CD28抗体の重鎖可変領域遺伝子断片と軽鎖可変領域遺伝子断片を結合させた1本鎖抗体断片 (scFV) 遺伝子のライブラリーを作製した。

[0116] 免疫されたマウスから脾臓を外科的に取得し、3mLのTRIzol Reagent (Invitrogen社製) を加えた後、ポリトロンにて組織を破碎した。添付説明書に従い、破碎液よりTotal RNAを抽出した。このTotal RNAよりoligotex-dT30 (super) mRNA purification kit (タカラバイオ社製) を用いて精製したmRNAを鋳型とし、Super Script III First-Strand Synthesis System (Invitrogen社製) を用いてcDNAを合成した。尚、cDNA合成の際には、同キットに含まれていたRandom Hexamersをプライマーとして使用した。

[0117] 341-1-19の重鎖 (配列番号1) を鋳型とし、5' -GCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG-3' (配列番号5) 及び、5' -CCGAGGCGCGCCACCGCTGCCACCGCCTCCTGAGGAGACGGTGACCGT-3' (配列番号6) をプライマーとして5' 末端にSfil配列、3' 末端煮をグリシンリッチ配列が付加された341-1-19の重鎖可変領域遺伝子断片を、また341-1-19の軽鎖 (配列番号3) を鋳型とし5' -CGGTGGGCGCGCCTCGGGCGGAGGTGGTTCAGAAATTGTGTTGACACAG-3' (配列番号7) 及

び、5' -CATTCTCGAGTTGCGGCCGCACGTTTGATATCCACTTTGGTC-3' (配列番号8) をプライマーとして5' 末端にグリシンリッチ配列、3' 末端にNotI配列が付加された341-1-19の軽鎖可変領域遺伝子断片を、それぞれDNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、58°C 30秒、68°C1分の反応を35サイクル実施することで増幅した。ここで使用したグリシンリッチ配列を配列番号9, 10に示す。このグリシンリッチ配列にはAscIの切断認識部位を挿入した。この得られたVH, VL遺伝子断片を、PCRにて付加したグリシンリッチ配列を用いて、Over Extension PCRによって連結し、341-1-19 scFv遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をSfiIとNotIで消化し、あらかじめSfiIとNotIで開裂したpCANTAB 5Eベクター (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)に挿入した。得られたプラスミドをpCANTAB5E/341-1-19と命名した。本件では341-1-19の軽鎖と共通のアミノ酸配列を有するヒトCD28を抗原とする抗体の取得を目的とするため、このプラスミドをSfiI、AscIで開裂 (341-1-19のVHをコードする遺伝子領域を除いた) 後、Alkaline Phosphatase (BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理したベクター遺伝子を、ライブラリー作製用のベクターとした。

- [0118] 免疫したマウス脾臓由来のcDNAを鋳型とし、ファージ抗体ライブラリー作製のための重鎖可変領域遺伝子断片を取得した。第一段階として、cDNAを鋳型とし、ヒト重鎖のシグナル領域に特異的なプライマー (配列番号11-35) 及び、IgG定常領域に特異的なプライマー (配列番号36) を用いて、DNAポリメラーゼ (KOD-Plus, 東洋紡社製) を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施した。第二段階として、これらPCR産物を鋳型として、ヒト重鎖の可変領域に特異的なプライマー (配列番号37-56) 及び、Junction領域に特異的なプライマー (配列番号57-61) を用いて、DNAポリメラーゼ (KOD-Plus, 東洋紡社製) を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施した。尚、可変領域に特異的なプライマーは第一段階のPCR反応の際に使用した可変領域に特異的なプライマーによって選択し、Junction領域に特異的なプライマーは5種を混合して使用した。(第一段階のPCR産物と可

変領域に特異的なプライマーの組み合わせを表1に示す。) また、配列番号37-56の5'末端にはSfilの切断認識部位を、配列番号57-61の5'末端にはAscIの切断認識部位及びリンカー配列を挿入した。

[表1]

ファージライブラリー作製に使用したプライマーの組み合わせ

PCR 反応 (第 1 段階)		PCR 反応 (第 2 段階)	
IgG シグナル配列 プライマー	IgG 定常領域 特異的プライマー	可変領域プライマー	Junction 領域に 特異的なプライマー
配列番号 11	配列番号 36	配列番号 37	配列番号 57 + 配列番号 58 + 配列番号 59 + 配列番号 60 + 配列番号 61
配列番号 11		配列番号 38	
配列番号 12		配列番号 39	
配列番号 13		配列番号 40	
配列番号 14		配列番号 41	
配列番号 15		配列番号 37	
配列番号 16		配列番号 42	
配列番号 11		配列番号 43	
配列番号 17		配列番号 44	
配列番号 18		配列番号 45	
配列番号 19		配列番号 46	
配列番号 20		配列番号 47	
配列番号 21		配列番号 48	
配列番号 22		配列番号 46	
配列番号 21		配列番号 46	
配列番号 23		配列番号 46	
配列番号 21		配列番号 49	
配列番号 24		配列番号 47	
配列番号 25		配列番号 46	
配列番号 26		配列番号 46	
配列番号 27		配列番号 46	
配列番号 28		配列番号 46	
配列番号 29		配列番号 50	
配列番号 29		配列番号 52	
配列番号 30		配列番号 51	
配列番号 31		配列番号 50	
配列番号 32		配列番号 50	
配列番号 33		配列番号 53	
配列番号 34		配列番号 54	
配列番号 35		配列番号 55	
配列番号 11	配列番号 56		

[0119] PCR反応にて増幅したVH遺伝子断片を混合し、Sfil、AscIで消化した後、ライブラリー作製のベクターにDNA Ligation Kit (タカラバイオ社製) を用いて、16°C一晩の反応を実施して挿入した。このライゲート液をエレクトロポレーションによって、TG1 Electroporation Competent Cells (STRATAGENE

社製)に導入した。この形質転換した大腸菌を2×YTAG培地(17gのBacto-tryptone, 10gのBact-yeast extract, 5gのNaClを蒸留水で1Lに調整した。オートクレーブ後、100 μg/ml ampicilin, 2% glucoseを添加した)にて30°Cで1時間振とう培養した後、スタンダードディッシュ(150×15mm, BD社製)を用いて作製したSOBAG培地プレート(20g Bacto-tryptone, 5g Bact-yeast extract, 15g Bacto-agar, 0.5g NaCl, 蒸留水900mlを加えオートクレーブした。50-60°Cに冷却後、10mlのsterile 1M MgCl<sub>2</sub>, 55.6mlの滅菌 2M glucose, Ampicilinを添加した。)に播き、30°Cで1晩インキュベートした。培地上にできたコロニー群を回収(1プレート当たり3mLの2×YTAG培地でコロニーを回収)し、scFv抗体ライブラリーとした。なお、本実施例では約5×10<sup>6</sup>個のコロニーを集めてライブラリーを作製した。

[0120] scFv抗体ライブラリー(100 μL)を2×YTAG培地(50mL)にて30°Cで600nmの吸光度が0.3から0.5になるまで振とう培養した。この培養液にM13K0ヘルパーファージを10~20のMOIで感染(30°C 1時間で振とう培養)後、培地を2×YTAK(17g Bacto-tryptone, 10g Bact-yeast extract, 5g NaClを蒸留水で1Lに調整した。オートクレーブ後、100 μg/ml ampicilin, 50 μg/ml kanamycinを添加した)に切り換え、30°Cで1晩振とう培養した。この培養上清を抗体ファージライブラリーとした。抗体ファージライブラリーはPEG(200gの Polyethylene glycol 8000と146.1gのNaClに蒸留水を加え1Lに溶かしオートクレーブした)による沈殿を行い、PBS(-)3mLに置換した。

[0121] [実施例4] ヒトCD28抗原の作製

ヒトCD28(配列番号62)は、Human Spleen Marathon Ready cDNA(Clontech社製)を鋳型とし、5'-ATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTCTCAACTTATTC-3'(配列番号63)及び、5'-TCAGGAGCGATAGGCTGCGAAGTCGCG-3'(配列番号64)をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C1分の反応を35サイクル実施することにより増幅した。この遺伝子断片を鋳型として使用し、ヒトCD28の細胞外ドメイン(配列番号65)とIgGのFc融合タンパク質(CD28-Fc)の発現ベクターを作製した。ヒトCD28の細

胞外領域の遺伝子断片を取得し、5'末端にKpnI配列を、3'末端にXbaI配列を付加するためのPCR反応を実施した。実際には、このヒトCD28 cDNAを鋳型とし、5'-GGGGGTACCATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTC-3' (配列番号66) 及び5'-GGGTCTAGACCAAAAGGGCTTAGAAGGTCCG-3' (配列番号67) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒を35サイクルのPCR反応を行った。このPCR反応にて増幅した遺伝子断片を、KpnI、XbaIで消化し、あらかじめヒトIgGのFc領域が挿入されていたpTracer-CMV/Zeo (Invitrogen社製) ベクターに挿入した。得られたプラスミドをpTracer/hECD28-Fcと命名した。

[0122] 作製した発現ベクター遺伝子をNucleobond PG2000EF (Macherey-NAGEL社製)にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System (Invitrogen社製)を用いて浮遊性293細胞に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。培養上清はベクター導入7日後に回収し、孔径0.22 µmのメンブランフィルター (MILLIPORE社製) で濾過した。この培養上清を抗体精製用アフィニティーカラムであるHiTrap rProtein A FF (カラム体積1ml) (GEヘルスケアバイオサイエンス社製) にチャージし、PBS (-) で洗浄後、20mMクエン酸ナトリウム、50mM NaCl緩衝液 (pH2.7) により溶出し、200mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) を含むチューブに回収した。次に、Q-Sepharose (Hitrap Q HP, GEヘルスケアバイオサイエンス社製) と、SP-Sepharose (HiTrap SP FF, GEヘルスケアバイオサイエンス社製) を連結したカラムにチャージして吸着し、20mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) にて洗浄後、1×PBSバッファーにて溶出した。この溶出液を孔径0.22 µmのメンブランフィルター (Millex-GV, MILLIPORE社製) でろ過滅菌し、組み換え型Fc融合タンパクを得た。精製ヒトCD28-Fc融合タンパク質の濃度は280nmの吸光度を測定した。

[0123] [実施例5] ヒトCD28を認識するscFv抗体を提示するファージの濃縮

Coating buffer (50mM carbonate buffer, pH9)にて10 µg/mLに調製したヒトCD28-Fc融合タンパク質をマキシソープイムノチューブ (スターチューブ型, NUNC社製) に加え、4°Cで1晩インキュベートし、固相化した。ブロッキング

グ試薬 (SuperBlock(登録商標) Blocking Buffer, PIERCE社製) を500mL加え、室温で1時間インキュベートし、ブロッキングを実施した。Washing buffer (0.1% Tween20-PBS)にて3回洗浄した後、あらかじめBlock Ace(大日本住友製薬社製)を2mL加えて室温で2時間インキュベートした抗体ファージライブラリーを加え、室温で2時間インキュベートした。Washing bufferにて10回洗浄した後、0.1M Glycine-HCl溶液 (pH2.2)にて溶出し、2M Tris-base溶液を加え中和した。この溶出したファージを再びTG1に感染させ、2×YTAG培地プレートに播き、30°Cで1晩インキュベートした。培地上にできたコロニー群を再び回収して上記手法にてパニングを行い、計3回実施した。

[0124] [実施例6] ヒトCD28を認識する抗体提示ファージの選定および抗CD28抗体 (341VL34および341VL36) の作製

パニングを実施した抗体ライブラリーより、各単コロニーを2×YTAG培地200 $\mu$ Lに接種し、30°Cで4から5時間振とう培養した。この培養液に $1 \times 10^{10}$ pfu/mLのM13K0ヘルパーファージを200 $\mu$ L加えて感染 (30°C 1時間で振とう培養) した後、培地を2×YTAKに切り換え、30°Cで1晩振とう培養した。この培養上清をファージ液として用いて、以下の手順 (ELISA) に従い、抗原への結合性を確認した。

[0125] Coating buffer (50mM carbonate buffer, pH9)にて2 $\mu$ g/mLに調整したヒトCD28-Fc融合タンパク質を50 $\mu$ L/wellでマキシソープPlate (NUNC社製)に播き、4°Cで1晩インキュベートし、固相化した。ブロッキング試薬 (SuperBlock (登録商標) Blocking Buffer, PIERCE社製) を200 $\mu$ L/well加え、室温で30分間インキュベートし、ブロッキングを実施した。そこに、各ファージ液を50 $\mu$ L/well加え、室温で1時間インキュベートした。Washing buffer (0.1% Tween20-TBS)にて3回洗浄した後、assay diluent (大日本住友製薬社製Block Aceを10%含む0.1%Tween20-TBS)で希釈したHRP/Anti-E Tag conjugate (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を各ウェルに50 $\mu$ L加え、更に室温にて1時間反応させた。Washing bufferにて3回洗浄後、TMB (DAKO社製)発色基質液を各ウェルに50 $\mu$ L加え、暗所にて室温でインキュベートし、発色させた後、0.5M

硫酸 (50  $\mu$ L/well) を加え、反応を停止した。波長450nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (SPECTRAMAX190, Molecular Devices社製) で測定した。

[0126] ELISAにて抗原への結合が確認された2種のscFv抗体を341VL34 scFv, 341VL36 scFvと命名した。取得したscFv抗体を通常型の抗体に変換するため、抗体遺伝子のクローニング及び発現ベクターの作製を行った。

[0127] 重鎖遺伝子断片を増幅するため、pCANTAB/341VL34及び、pCANTAB/341VL36を鋳型とし、5' -AAAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC-3' (配列番号68) 及び、5' -TGAGGAGACGGTGACCGTGG-3' (配列番号69) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ (KOD-Plus, 東洋紡社製) を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施した。この遺伝子断片を鋳型として使用し、その5' 末端にSalI配列、Kozac配列及び、シグナルをコードする配列を、その3' 末端にNheI配列を付加するためのPCR反応を実施した。各重鎖遺伝子断片を鋳型とし、5' -GGGGTCGACACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATT TAAAAGGTGTCCAGTGT-3' (配列番号70) 及び5' -GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACC-3' (配列番号71) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ (KOD-Plus, 東洋紡社製) を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒を35サイクルのPCR反応を行った。341VL34 scFv及び341VL36 scFvの軽鎖は341-1-19と共通のアミノ酸配列であるため、341-1-19発現ベクター (特願2003-431408に記載のN5KG2Serを使用) の重鎖可変領域をSalI、NheIで切り出し、SalI、NheIで消化した341VL34scFv、341VL36scFv由来の重鎖遺伝子断片を挿入した。341-1-19の軽鎖 (配列番号2) と341VL34scFv由来の重鎖から構成される抗体を、341VL34, 341-1-19の軽鎖 (配列番号2) と 341VL36scFv由来の重鎖から構成される抗体を341VL36と名付けた。

[0128] 341VL34 重鎖核酸配列 (配列番号72) 、341VL34重鎖アミノ酸配列 (配列番号73) 341VL36 重鎖核酸配列 (配列番号74) 、341VL36重鎖アミノ酸配列 (配列番号75) はそれぞれ配列表に示す。

[0129] 341VL34抗体重鎖核酸の翻訳開始点は、配列番号72の5' 末端から1番目のア

デニン（A）からはじまるATGコドンであり、終止コドンは1417番目のチミン（T）からはじまるTGAである。抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から438番目のアデニン（A）と439番目のグアニン（G）間に位置する。アミノ酸配列において、重鎖可変領域は配列番号73のN末端から146番目のセリン（S）残基までであり、147番目のアラニン（A）以降が定常領域である。重鎖のシグナル配列は配列番号73のN末端より19番目のシステイン（C）までであり、成熟体のN末端は20番目のグルタミン酸（E）であるものとする。

- [0130] 341VL36抗体重鎖核酸の翻訳開始点は、配列番号74の5'末端から1番目のアデニン（A）からはじまるATGコドンであり、終止コドンは1417番目のチミン（T）からはじまるTGAである。抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から438番目のアデニン（A）と439番目のグアニン（G）間に位置する。アミノ酸配列において、重鎖可変領域は配列番号75のN末端から146番目のセリン（S）残基までであり、147番目のアラニン（A）以降が定常領域である。重鎖のシグナル配列は配列番号75のN末端より19番目のシステイン（C）までであり、成熟体のN末端は20番目のグルタミン酸（E）であるものとする。

[0131] [実施例7] 作製した多価抗体の構造

本発明で作製した多価抗体の構造的特徴を図1に示す。2種類の抗体由来の可変領域をリンカーで結合している。抗体は、抗CD40抗体として1種類（341-1-19）、抗CD28抗体として2種類（341VL34, 341VL36）を使用し、それぞれリンカーの構造と位置の組み合わせを変えたものを作製して試験を実施した。実施例における多価抗体のリンカーとしては、341-1-19由来のIgG2サブクラスのCH1領域を含む配列番号77のリンカー、もしくは、CH1、ヒンジ、CH2、CH3領域を含む配列番号99のリンカーが挿入されている。しかしながら、本発明で用いられるリンカーはこれらのリンカーに限定されるものではない。

- [0132] 表2に、作製した多価抗体の構造をまとめた。

[表2]

## 多価抗体の構造

多価抗体の名前	N末側に 使用した 抗体名	C末側に 使用した 抗体名	リンカーの 配列番号	リンカー アミノ酸長
341VL34-CH1-341	341VL34	341-1-19	76, 77	100
341-CH1-341VL34	341-1-19	341VL34	76, 77	100
DVD341VL34-341	341VL34	341-1-19	87, 88	6
341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1	341VL34	341-1-19	98, 99	328
341VL36-CH1-341	341VL36	341-1-19	76, 77	100
341-CH1-341VL36	341-1-19	341VL36	76, 77	100
DVD341VL36-341	341VL36	341-1-19	87, 88	6
341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1	341VL36	341-1-19	98, 99	328

[0133] [実施例8] CD28に対する抗原認識部位 (341VL34由来) をN末側にCD40に対する抗原認識部位 (341-1-19由来) をC末側に有し、配列番号77のリンカーを含む多価抗体 (341VL34-CH1-341) の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体341VL34の重鎖可変領域を、リンカー (配列番号77) を介して抗CD40抗体341-1-19の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、341-1-19と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。この多価抗体を、341VL34-CH1-341と名づけた。

[0134] 重鎖の間 (341VL34の重鎖の3' 末端、341-1-19の重鎖の5' 末端) にはCH1配列 (Kabat EUインデックス118番から215番) とさらに、その3' 末端にBamHI配列 (GGATCC) を付加した配列 (配列番号76, 77) をリンカーとして挿入している。

[0135] 341VL34-CH1-341 の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0136] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5' -GGGGCTAGCACCAAGGGCCCATC-3' (配列番号78) 及び、5' -GGATCCAAGTGTCTTGTCCACCTTGG-3' (配列番号79) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ (KOD-Plus, 東洋紡社製) を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5' 末端にNheI配列を付加したリンカー遺伝子断片を増幅した。341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5

' -GTGGACAAGACAGTTGGATCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGTC-3' (配列番号80) 及び、5'  
' -CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC-3' (配列番号81) をプライマーとして、  
DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68  
°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5' 末端にリンカー遺伝子 (3'  
末端側から21塩基) を、3' 末端にNheI配列を付加した341-1-19の重鎖遺伝子  
断片を増幅した。この得られた2つの遺伝子断片を、Over Extension PCRに  
よって連結し、リンカー - 341-1-19重鎖の遺伝子断片を作製した。この遺伝  
子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase (BAP, タカ  
ラバイオ社製)で脱リン酸化処理した341VL4発現ベクターに挿入した。

[0137] 341VL34-CH1-341 重鎖核酸配列 (配列番号82)、341VL34-CH1-341 重鎖ア  
ミノ酸配列 (配列番号83) はそれぞれ配列表に示す。

[0138] [実施例9] CD40に対する抗原認識部位 (341-1-19由来) をN末側に、CD28  
に対する抗原認識部位 (341VL34由来) をC末側に有し、配列番号77のリンカ  
ーを含む多価抗体 (341-CH1-341VL34) の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD40に対する抗原認識部位とCD28に対する抗原認識部位が並  
んだ多価抗体を作製するため、341-1-19の重鎖可変領域を配列番号77のリン  
カーを介して341VL34の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、341-1-  
19と共通のものを抗CD28抗体も使用する。重鎖の間 (341VL34の重鎖の3' 末  
端、341-1-19の重鎖の5' 末端) にはCH1配列 (Kabat EUインデックス118番か  
ら215番) とさらに、その3' 末端にBamHI配列 (GGATCC) を付加した配列 (配  
列番号76, 77) をリンカーとして挿入している。この抗体を341-CH1-341VL34  
と名づけた。

[0139] 341-CH1-341VL の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0140] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5' -GGGGCTAGCACCAAGGGCCCATC-3' (配列番  
号78) 及び、5' -GGATCCAAGTGTCTTGTCCACCTTGG-3' (配列番号79) をプライ  
マーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、  
55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5' 末端にNheI配列  
を付加したリンカー遺伝子断片を増幅した。341VL-34重鎖配列を鋳型とし、5

' -GTGGACAAGACAGTTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC-3' (配列番号84) 及び、5' -CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC-3' (配列番号81) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にリンカー遺伝子(3'末端21塩基)を、3'末端にNheI配列を付加した341-1-19の重鎖遺伝子断片を増幅した。この得られた2つの遺伝子断片を、Over Extension PCRによって連結し、リンカー - 341VL34重鎖の遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した341-1-19発現ベクターに挿入した。

[0141] 341-CH1-341VL34 重鎖核酸配列(配列番号85)、341-CH1-341VL34 重鎖アミノ酸配列(配列番号86)はそれぞれ配列表に示した。

[0142] [実施例10] CD28に対する抗原認識部位(341VL34由来)をN末側にCD40に対する抗原認識部位(341-1-19由来)をC末側に有し、配列番号88の短いリンカーで2つの抗原認識部位を連結した多価抗体(DVD341VL34-341)の発現ベクターの作製

多価抗体の安定性を比較するために、Wuらの報告(非特許文献5)にしたがって、複数の抗原認識部位が短いアミノ酸配列(6アミノ酸)からなるリンカー(配列番号87、88)で連結された多価抗体を作製した。Wuらの報告による、短いリンカーを用いた多価抗体をDVDIgGと呼ぶ。具体的には、抗CD40抗体341-1-19と抗CD28抗体341VL34をもとにDVD-IgGを作製した。N末側から、CD28、CD40の順で抗原認識部位が存在するDVD-IgGをDVD341VL34-341と名づけた。341-1-19の重鎖可変領域のN末端側に341VL34可変領域をタンデムに結合した。

[0143] 軽鎖については341-1-19の軽鎖可変領域のN末端側に341VL34軽鎖可変領域をタンデムに結合した。可変領域の間には、軽鎖kappa定常領域の部分配列(配列番号89、90: Kabat EUインデックスの108番目から113番目まで)をリンカーとして挿入している。

[0144] DVD341VL34-341の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

- [0145] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5' -GTGTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCACAGGTCCA ACTGCAGCAGTC -3' (配列番号91) 及び、5' -CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC-3' (配列番号81) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5' 末端にリンカー遺伝子配列(リンカーの5' 末端はNheI配列)を、3' 末端にNheI配列を付加した341-1-19の重鎖遺伝子断片を増幅した。この遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した341VL34発現ベクターに挿入した。さらにこのベクターに下記の方法で作製した軽鎖を挿入した。
- [0146] DVD341VL34-341の軽鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。
- [0147] 341-1-19軽鎖を鋳型とし、5' -GGGCGTACGGTGGCTGCACCAGAAATTGTGTTGACACAGTC-3' (配列番号92) 及び、5' -GGGCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCC-3' (配列番号93) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5' 末端にリンカー遺伝子配列(リンカーの5' 末端はBsiWI配列)を、3' 末端にBsiWI配列を付加した付加した341-1-19の軽鎖遺伝子断片を増幅した。この遺伝子断片をBsiWIで消化し、BsiWIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した、上述のDVD341VL34-341-1-19を保持する発現ベクターに挿入した。
- [0148] DVD341VL34-341重鎖核酸配列(配列番号94)、DVD341VL34-341 重鎖アミノ酸配列(配列番号95)、DVD341VL34-341軽鎖核酸配列(配列番号96)、DVD341VL34-341軽鎖核酸配列(配列番号97)は配列表に記載した。
- [0149] [実施例11] CD28に対する抗原認識部位(341VL34由来)をN末側に、CD40に対する抗原認識部位(341-1-19由来)をC末側に有し、配列番号99のリンカーを含む多価抗体(341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1)の発現ベクターの作製  
重鎖N末側から順に、CD28、CD40認識部位が存在し、長い配列番号98、99のリンカー(CH1, ヒンジ, CH2, CH3 : Kabat EUインデックス118番目から447番目)を保持する多価抗体を作製した。具体的には341-1-19の可変領域に配列

番号98、99のリンカーを介して341VL34の可変領域を連結した。3'末端には終止コドンであるTGAを付加した。軽鎖は、341-1-19と共通のものを抗CD28抗体も使用する。この抗体を341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1と名づけた。

[0150] 341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0151] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5'-GTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCA-3' (配列番号100) 及び、5'-GGGGATCCTTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3' (配列番号101) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、3'末端にBamHI配列を付加したリンカー遺伝子断片(Linkerの5'末端はNheI配列)を増幅した。この得られた遺伝子断片をNheI, BamIで消化し、NheI, BamHIで開裂し、重鎖定常領域をコードする遺伝子領域を除いた、341VL34発現ベクターに挿入した。この発現ベクターの3'側に、341-1-19重鎖を鋳型とし、5'-GATATCAAAGGATCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGTC-3' (配列番号102) 及び、5'-GGGGGATCCTCAAAGTGTCTTGTCCACCTTGG-3' (配列番号103) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5'末端にBamHI配列を、3'末端に(3'末端から)BamHI配列、終止コドン及びCH1領域(118番目のアデニンから215番目のバリン)をコードする遺伝子配列を付加した341-1-19の重鎖可変領域とCH1領域を、BamHIで消化し挿入した。

[0152] 341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1 重鎖核酸配列(配列番号104)、341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1 重鎖アミノ酸配列(配列番号105)はそれぞれ配列表に記載した。

[0153] [実施例12] CD28に対する抗原認識部位(341VL36由来)をN末側にCD40に対する抗原認識部位(341-1-19由来)をC末側に有し、配列番号77のリンカーを含む多価抗体(341VL36-CH1-341)の発現ベクターの作製

重鎖N末側から順番に、CD28、CD40認識部位が存在する多価抗体を作製するため、341VL36重鎖可変領域を配列番号77のリンカーを介して341-1-19の重鎖

可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、341-1-19と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。この多価抗体を、341VL36-CH1-341と名づけた。

[0154] 重鎖の間（341VL-34の重鎖の3'末端、341-1-19の重鎖の5'末端）にはCH1配列（Kabat EUインデックス118番から215番）とさらに、その3'末端にBamHI配列（GGATCC）を付加した配列（配列番号76, 77）をリンカーとして用いた。

[0155] 341VL34-CH1-341の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0156] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5'-GGGGCTAGCACCAAGGGCCCATC-3'（配列番号78）及び、5'-GGATCCAACCTGTCTTGTCCACCTTGG-3'（配列番号79）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にNheI配列を付加したリンカー遺伝子断片を増幅した。341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5'-GTGGACAAGACAGTTGGATCCCAGGTCCAACCTGCAGCAGTC-3'（配列番号80）及び、5'-CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC-3'（配列番号81）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にリンカー配列（3'末端側から21塩基）を、3'末端にNheI配列を付加した341-1-19の重鎖遺伝子断片を増幅した。この得られた2つの遺伝子断片を、Over Extension PCRによって連結し、リンカー - 341-1-19重鎖の遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase (BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した341VL36発現ベクターに挿入した。

[0157] 341VL36-CH1-341重鎖核酸配列（配列番号106）、341VL36-CH1-341重鎖アミノ酸配列（配列番号107）は、それぞれ配列表に記載した。

[0158] [実施例13] CD40に対する抗原認識部位（341-1-19由来）をN末側に、CD28に対する抗原認識部位（341VL36由来）をC末側に有し、配列番号77のリンカーを含む多価抗体（341-CH1-341VL36）の発現ベクターの作製

重鎖N末側から順番に、CD40、CD28認識部位が存在する多価抗体を作製するため、341-1-19重鎖可変領域を配列番号77のリンカーを介して341VL36の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、341-1-19と共通のものを抗CD28抗体も使用する。重鎖の間（341VL36の重鎖の3'末端、341-1-19の重鎖の5'末端）にはCH1配列（Kabat EUインデックス118番から215番）とさらに、その3'末端にBamHI配列（GGATCC）を付加した配列（配列番号76, 77）をリンカーとして挿入した。この抗体を341-CH1-341VL36と名づけた。

- [0159] 341-CH1-341VL36の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。
- [0160] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5' -GGGGCTAGCACCAAGGGCCCATC-3'（配列番号78）及び、5' -GGATCCAACCTGTCTTGTCCACCTTGG-3'（配列番号79）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にNheI配列を付加したLinker遺伝子断片を増幅した。341VL36を鋳型とし、5' -GTGGACAAGACAGTTGGATCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTC-3'（配列番号84）及び、5' -CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC-3'（配列番号81）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にLinker遺伝子（3'末端21塩基）を、3'末端にNheI配列を付加した341-1-19の重鎖遺伝子断片を増幅した。この得られた2つの遺伝子断片を、Over Extension PCRによって連結し、リンカー - 341VL36重鎖の遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase (BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した341-1-19発現ベクターに挿入した。
- [0161] 341-CH1-341VL36重鎖核酸配列（配列番号108）、341-CH1-341VL36重鎖アミノ酸配列（配列番号109）の配列はそれぞれ配列表に記載した。
- [0162] [実施例14] CD28に対する抗原認識部位（341VL36由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（341-1-19由来）をC末側に有し、短い配列番号88のリンカーで2つの抗原認識部位を連結した多価抗体（DVD341VL36-341）の発現ベクターの作製

多価抗体の安定性を比較するために、Wuらの報告（非特許文献5.）にしたがって、341-1-19, 341VL36抗体をもとに、DVD-IgGを作製した。N末側から、CD28、CD40の順で認識部位が存在するDVD-IgGをDVD341VL36-341と名づけた。341-1-19の重鎖可変領域のN末端側に341VL34可変領域をタンデムに結合した。可変領域の間には、6アミノ酸からなる配列番号87, 88のリンカーを挿入している。

[0163] 軽鎖については341-1-19の軽鎖可変領域のN末端側に341VL36軽鎖可変領域をタンデムに結合した。可変領域の間には、軽鎖kappa定常領域の部分配列（配列番号89, 90: Kabat EUインデックスの108番目から113番目まで）をリンカーとして挿入している。

[0164] DVD341VL36-341の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0165] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5' -GTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCACAGGTCCA ACTGCAGCAGTC -3'（配列番号91）及び、5' -CTTGGTGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC-3'（配列番号84）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5'末端にリンカー遺伝子配列を、3'末端にNheI配列を付加した341-1-19の重鎖遺伝子断片を増幅した。この遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した341VL36発現ベクターに挿入した。さらにこのベクターに下記の方法で作製した軽鎖を挿入した。

[0166] DVD341VL36-341の軽鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0167] 341-1-19軽鎖配列を鋳型とし、5' -GGGCGTACGGTGGCTGCACCAGAAATTGTGTTGAC ACAGTC-3'（配列番号92）及び、5' -GGGCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCC-3'（配列番号93）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5'末端にリンカー配列を、3'末端にBsiWI配列を付加した付加した341-1-19の軽鎖遺伝子断片を増幅した。この遺伝子断片をBsiWIで消化し、BsiWIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処

理した、上述の、DVD341VL36-341の重鎖を保持する発現ベクターに挿入した。

[0168] DVD341VL36-341重鎖核酸配列（配列番号110）、DVD341VL36-341重鎖アミノ酸配列（配列番号111）、DVD341VL36-341軽鎖核酸配列（配列番号112）、DVD341VL36-341軽鎖核酸配列（配列番号113）はそれぞれ配列表に記載した。

[0169] [実施例15] CD28に対する抗原認識部位（341VL34由来）をN末側に、CD40に対する抗原認識部位（341-1-19由来）をC末側に有し、配列番号99のリンカーを含む多価抗体（341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1）の発現ベクターの作製

重鎖N末側から順に、CD28、CD40認識部位が存在し、長い配列番号99のリンカーを保持する多価抗体を作製した。341-1-19の重鎖可変領域を配列番号98、99のリンカーを介して341VL36重鎖可変領域にタンデムに結合した。3'末端には終止コドンであるTGAを付加した。軽鎖は、341-1-19と共通のものを抗CD28抗体も使用する。この抗体を341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1と名づけた。

[0170] 341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0171] 341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5'-GTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCA-3'（配列番号100）及び、5'-GGGGATCCTTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'（配列番号101）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus、東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、3'末端にBamHI配列を付加したリンカー遺伝子断片を増幅した。この得られた遺伝子断片をNheI、BamHIで消化し、NheI、BamHIで開裂した341VL36発現ベクターに挿入した。このベクターの3'側に、341-1-19重鎖配列を鋳型とし、5'-GATA TCAAAGGATCCCAGGTCCAACTGCAGCAGTC-3'（配列番号102）及び、5'-GGGGATCC TCAAAGTGTCTTGTCCACCTTGG-3'（配列番号103）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus、東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒

の反応を35サイクル実施することで、5'末端にBamHI配列を、3'末端に（3'末端から）BamHI配列、終止コドン及びCH1領域（118番目のスレオニンから215番目のバリン）をコードする遺伝子配列を付加した341-1-19の重鎖可変領域とCH1領域を、BamHIで消化し挿入した。341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1重鎖核酸配列（配列番号114）、341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1重鎖アミノ酸配列（配列番号115）は配列表に記載した。

[0172] [実施例16] 多価抗体の発現と精製

作製した発現ベクター遺伝子をQIAGEN Plasmid Maxi Kit（キアゲン社製）にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System（Invitrogen社製）を用いて浮遊性293細胞に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。培養上清はベクター導入7日後に回収し、孔径0.22  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター（MILLIPORE 製）で濾過した。この培養上清から、ProteinA樹脂（MabSelect, GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いてアフィニティー精製した。洗浄液としてリン酸緩衝液、溶出緩衝液として20mMクエン酸ナトリウム、50mM NaCl緩衝液（pH2.7）を用いた。溶出画分は200mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）を添加してpH6.0付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜（10000カット、Spectrum Laboratories社製）を用いてリン酸緩衝液に置換し、孔径0.22  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター（Millex-GV, MILLIPORE社製）でろ過滅菌し、精製抗体を得た。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/mLを抗体の濃度は1.40 Optimal densityとして算出した。

[0173] [実施例17] 抗体の生産性の測定

抗体の生産性として、各培養上清中の抗体含有量を測定した。抗体含有量の測定は、高速液体クロマトグラフ装置（日立社製）及びPOROS 50 A（Applied Biosystem社製, cat. 4319037）と、溶媒として20mM Phosphate, 300mM NaCl pH7.0を用いて分析を行った。抗体の含有量は各培養上清を注入して得られたピーク面積と、1, 2, 5, 10  $\mu\text{g}$  の精製ヒト抗体（IgG1）を注入して得られたピーク面積とを比較することで算出した。

[0174] その結果を表3に示す。表3より短いリンカーを介した多価抗体は生産性

が低いことがわかった。

[表3]

各抗体の生産性

抗体	培養上清中の抗体濃度		リンカーアミノ酸数
	$\mu\text{g/mL}$	nM	
341-1-19	3.94	26.87	---
341VL34	2.5	17.23	—
341VL36	2.85	19.60	—
341VL34-CH1-341	5.47	22.73	100
341-CH1-341VL34	6.22	25.85	100
DVD341VL34-341	0.99	4.98	6
341VL34-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1	4.67	19.41	328
341VL36-CH1-341	6.1	25.32	100
341-CH1-341VL36	6.47	26.85	100
DVD341VL36-341	1.1	5.53	6
341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1	4.78	19.84	328

[0175] [実施例18] 抗体の安定性の評価

抗体溶液の凝集体含有率は、高速液体クロマトグラフ装置（島津社製）及びTSK-G3000 SWカラム（東ソー社製）と、溶媒として20mMリン酸ナトリウム、500mM NaCl, pH7.0を用いて分析を行った。各抗体を40 $\mu\text{g}$ 注入し、溶出位置をゲルろ過HPLC用分子量マーカー（オリエンタル酵母社製Cat No. 40403701）と比較することで、抗体蛋白の単量体とそれ以上の凝集体のピークを同定して、それぞれのピーク面積から凝集体の含有率を算出した。

[0176] その結果を表4に示す。表4より短いリンカーでは精製過程で多くの凝集体が発生し、多価抗体の水溶液中における安定性が悪いことがわかった。

[表4]

各精製抗体の凝集体含有量

抗体	凝集体含量 (%)	リンカーアミノ酸数
341VL34-CH1-341	1.01	100
341-CH1-341VL34	2.11	100
DVD341VL34-341	28.3	6
341VL34-CH1-H-6CH2-CH3-341-CH1	0.86	328

[0177] [実施例19] 抗体の抗原結合性の評価

作製した2つ（CD40及びCD28）の認識部位を有する抗体の各抗原への結合を

以下の手順に従い確認した。

[0178] Coating buffer (50 mM carbonate buffer, pH9)にて1  $\mu$ g/mLに調製したヒトCD40-Fc融合タンパク質及び、ヒトCD28-Fc融合タンパク質を50  $\mu$ L/wellでマキシソープPlate (NUNC社製)に播き、4°Cで1晩インキュベートし、固相化した。ブロッキング試薬 (SuperBlock (登録商標) Blocking Buffer, PIERCE社製) を200  $\mu$ L/well加え、室温で30分間インキュベートし、ブロッキングを実施した。そこに、上記実施例で得た各抗体を含んだ培養上清を50  $\mu$ L/well加え、室温で1時間インキュベートした。Washing buffer (0.1% Tween20-TBS)にて3回洗浄した後、assay diluent (大日本住友製薬社製Block Aceを10%含む0.1%Tween20-TBS)で希釈したAffinity Isolated Antibody HRP Conjugated Goat F(ab)<sub>2</sub> anti-Human kappa (EY Lab.社製)を各ウェルに50  $\mu$ L加え、更に室温にて1時間反応させた。Washing bufferにて3回洗浄後、TMB (DAKO社製)発色基質液を各ウェルに50  $\mu$ L加え、暗所にて室温でインキュベートし、発色させた後、0.5M硫酸 (50  $\mu$ L/well)を加え、反応を停止した。波長450 nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー (SPECTRAMAX190, Molecular Devices社製)で測定した。

[表5]

抗体の抗原への結合

抗体	固相抗原	
	human CD40	human CD28
341-1-19	○	×
341VL34	×	○
341VL36	×	○
341VL34-CH1-341	○	○
341-CH1-341VL34	○	○
DVD341VL34-341	○	○
341-CH1-H-CH2-CH3-341VL34-CH1	○	○
341VL36-CH1-341	○	○
341-CH1-341VL36	○	○
DVD341VL36-341	○	○
341VL36-CH1-H-CH2-CH3-341-CH1	○	○

[0179] [実施例20] 第1の抗原認識部位の取得

新たな抗CD40抗体を、実施例1と同様にしてして抗CD40抗体281を確立した

。

[0180] [実施例21] 抗CD40抗体の軽鎖と共通の軽鎖を有する抗CD28抗体のscFVライブラリーの作製

実施例20の抗CD40抗体281の軽鎖と共通の軽鎖を有する抗CD28抗体をスクリーニングするために、実施例2で作製されたCD28で免疫されたマウスの脾臓を用いて、抗CD28抗体の重鎖可変領域遺伝子断片と軽鎖可変領域遺伝子断片を結合させた1本鎖抗体断片（scFV）遺伝子のライブラリーを作製した。

[0181] 281の重鎖（配列番号116）を鋳型とし、5' -GCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGCAGGAG-3'（配列番号120）及び、5' -CCGAGGCGCGCCACCGCTGCC ACCGCCTCCTGAGGAGACGGTGACCAG-3'（配列番号121）をプライマーとして5' 末端にSfiI配列、3' 末端にグリシンリッチ配列が付加された281の重鎖可変領域遺伝子断片を、また281の軽鎖（配列番号118）を鋳型とし5' -CGGTGGGCGCG CCTCGGGCGGAGGTGGTTCAGAAATTGTGTTGACGCAG-3'（配列番号122）及び、5' -GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCAGTTTGATCTCCAGTCGTGTCCG-3'（配列番号123）をプライマーとして5' 末端にグリシンリッチ配列、3' 末端にNotI配列が付加された281の軽鎖可変領域遺伝子断片を、それぞれDNAポリメラーゼ（KOD-Plus，東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、58°C 30秒、68°C1分の反応を35サイクル実施することで増幅した。この得られたVH，VL遺伝子断片を、実施例3と同様にOver Extension PCRによって連結し、281 scFv遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をSfiIとNotIで消化し、あらかじめSfiIとNotIで開裂したpCANTAB 5Eベクター（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）に挿入した。得られたプラスミドをpCANTAB5E/281と命名した。本件では281の軽鎖と共通のアミノ酸配列を有するヒトCD28を抗原とする抗体の取得を目的とするため、このプラスミドをSfiI、AscIで開裂（341-1-19のVHをコードする遺伝子領域を除いた）後、Alkaline Phosphatase（BAP，タカラバイオ社製）で脱リン酸化処理したベクター遺伝子を、ライブラリー作製用のベクターとした。

[0182] 実施例3で合成したcDNAを鋳型とし、ファージ抗体ライブラリー作製のための重鎖可変領域遺伝子断片を取得した。このcDNAを鋳型とし、ヒト重鎖の可

変領域に特異的なプライマー（配列番号124-131）及び、Junction領域に特異的なプライマー（配列番号132-135）を用いて、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施した。尚、Junction領域に特異的なプライマーは5種を混合して使用した。また、配列番号124-131の5'末端にはSfiIの切断認識部位を、配列番号132-135の5'末端にはAclIの切断認識部位及びリンカー配列を挿入した。

[0183] これらPCR反応にて増幅したVH遺伝子断片を、実施例3の手順に従いpCANTAB 5E/281を用いて作製したベクターに挿入し、scFv抗体ライブラリーを作製した。尚、本実施例では約 $5 \times 10^5$ 個のコロニーを集めてライブラリーを作製した。このscFv抗体ライブラリーより抗体ファージライブラリーを調整した。

[0184] [実施例22] ヒトCD28を認識するscFv抗体を提示するファージの濃縮  
実施例21にて作製した抗体ファージライブラリーの濃縮を実施例5の手順に従い実施した。

[0185] [実施例23] ヒトCD28を認識する抗体提示ファージの選定および抗CD28抗体（281VL4）の作製  
実施例6の手順に従い抗体提示ファージの選定を行った。

[0186] ELISAにて抗原への結合が確認されたscFv抗体を281VL4 scFvと命名した。取得したscFv抗体を通常型の抗体に変換するため、抗体遺伝子のクローニング及び発現ベクターの作製を行った。

[0187] 重鎖遺伝子断片を増幅するため、pCANTAB/281VL4を鋳型とし、5' -CTGCTGG TGGCGGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCGAGGTCCAGCTGGTG-3'（配列番号136）及び、5' -TGAGGAGACGGTGACCA-3'（配列番号137）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施した。この遺伝子断片を鋳型として使用し、その5'末端にSalI配列、Kozac配列及び、シグナルをコードする配列を、その3'末端にNheI配列を付加するためのPCR反応を実施した。各重鎖遺伝子断片を鋳型とし、5' -GGGGTCGACACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGG-3'（配列番号138）及び5' -GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCA-3'（配列番号139）をプライマ

ーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、58°C30秒、68°C30秒を35サイクルのPCR反応を行った。281VL4 scFvの軽鎖は281と共通のアミノ酸配列であるため、281発現ベクター(W02002/088186に記載のN5KG4PEを使用)の重鎖可変領域をSalI、NheIで切り出し、SalI、NheIで消化した281VL4 scFv由来の重鎖遺伝子断片を挿入した。281の軽鎖(配列番号118, 119)と281VL4 scFv由来の重鎖から構成される抗体を、281VL4と名づけた。

- [0188] 281VL4 重鎖核酸配列(配列番号140)、281VL4重鎖アミノ酸配列(配列番号141)はそれぞれ配列表に示す。
- [0189] 281VL4抗体重鎖核酸の翻訳開始点は、配列番号140の5'末端から1番目のアデニン(A)からはじまるATGコドンであり、終止コドンは1417番目のチミン(T)からはじまるTGAである。抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から435番目のアデニン(A)と436番目のグアニン(G)間に位置する。アミノ酸配列において、重鎖可変領域は配列番号141のN末端から145番目のセリン(S)残基までであり、146番目のアラニン(A)以降が定常領域である。重鎖のシグナル配列は配列番号141のN末端より19番目のセリン(S)までであり、成熟体のN末端は20番目のグルタミン酸(E)であるものとする。
- [0190] [実施例24] CD28に対する抗原認識部位(281VL4由来)をN末側にCD40に対する抗原認識部位(281由来)をC末側に有し、表6のリンカーを含む多価抗体(281VL4-CH1-281、281VL4-CH1(118-131)-281、281VL4-CH1(118-130)-281)の発現ベクターの作製
- 重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表6に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。これら多価抗体を、281VL4-CH1-281、281VL4-CH1(118-131)-281、281VL4-CH1(118-130)-281と名づけた。

[表6]

多価抗体の Linker 構造

Linker		
名	アミノ酸配列	塩基配列
CH1	ASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGA LTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSST LGTIKTYTCNVDPKPS NTRVDRKRVGS	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTG ACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGAC TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTGGG CACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATACAAGCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAGAGTTGGATCC
CH1 (118-131)	ASTKGPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1 (118-130)	ASTKGPSVFPLAP	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC

[0191] 281VL4-CH1-281は、重鎖の間（281VL4の重鎖の3'末端、281の重鎖の5'末端）にはIgG4のCH1配列（Kabat EUインデックス118番から215番）とさらに、その3'末端にBamHI配列（GGATCC）を付加した配列をリンカーとして挿入している。

[0192] 281VL4-CH1-281の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0193] 281重鎖配列を鋳型とし、5'-GGGGCTAGCACCAAGGGGGCA-3'（配列番号144）及び、5'-GGATCCAACCTCTTGTCCACCTT-3'（配列番号145）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にNheI配列を付加したリンカー遺伝子断片を増幅した。281重鎖配列を鋳型とし、5'-AAGAGAGTTGGATCCAGGTGCAGCTGCAG-3'（配列番号146）及び、5'-GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCA-3'（配列番号147）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することで、5'末端にリンカー遺伝子（3'末端側から15塩基）を、3'末端にNheI配列を付加した281の重鎖遺伝子断片を増幅した。この得られた2つの遺伝子断片を、Over Extension PCRによって連結し、リンカー - 281重鎖の遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase (BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した281VL4発現ベクターに挿入した。281VL4-CH1-281重鎖核酸配列（配列番号148）、281VL4-CH1-281重鎖アミノ酸配列（配列番号149）はそれぞれ配列表に

示す。

- [0194] 重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、リンカー（配列番号151）を介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。この多価抗体を、281VL4-CH1(118-131)-281と名づけた。
- [0195] 281VL4-CH1(118-131)-281は、重鎖の間（281VL4の重鎖の3'末端、281の重鎖の5'末端）にはIgG4のCH1配列（Kabat EUインデックス118番から131番）をリンカーとして挿入している。
- [0196] 281VL4-CH1(118-131)-281の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。
- [0197] 281重鎖配列を鋳型とし、5'-GTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC-3'（配列番号150）及び、5'-GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCA-3'（配列番号147）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施した。このPCR産物を鋳型とし、5'-GGGGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC-3'（配列番号151）及び、5'-GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCA-3'（配列番号147）をプライマーとして、DNAポリメラーゼ（KOD-Plus, 東洋紡社製）を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5'末端にリンカー遺伝子（リンカー配列の5'末端はNheI配列である。）を、3'末端にNheI配列を付加した281の重鎖遺伝子断片を増幅した。この得られた遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した281VL4発現ベクターに挿入した。281VL4-CH1(118-131)-281重鎖核酸配列（配列番号152）、281VL4-CH1(118-131)-281重鎖アミノ酸配列（配列番号153）はそれぞれ配列表に示す。
- [0198] 281VL4-CH1(118-130)-281は、重鎖の間（281VL4の重鎖の3'末端、281の重鎖の5'末端）にはIgG4のCH1配列（Kabat EUインデックス118番から130番）

をリンカーとして挿入している。

[0199] 281VL4-CH1(118-130)-281 の重鎖をコードする遺伝子配列は以下の手順で作製した。

[0200] 281重鎖配列を鋳型とし、5' -GTCTTCCCCTGGCGCCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC-3' (配列番号154) 及び、5' -GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCA-3' (配列番号147) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施した。このPCR産物を鋳型とし、5' -GGGGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCTGGCGCCC-3' (配列番号151) 及び、5' -GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCA-3' (配列番号147) をプライマーとして、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)を用いて、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を35サイクル実施することで、5' 末端にリンカー遺伝子(リンカー配列の5' 末端はNheI配列である。)を、3' 末端にNheI配列を付加した281の重鎖遺伝子断片を増幅した。この得られた遺伝子断片をNheIで消化し、NheIで開裂した後Alkaline Phosphatase(BAP, タカラバイオ社製)で脱リン酸化処理した281VL4発現ベクターに挿入した。281VL4-CH1(118-130)-281 重鎖核酸配列(配列番号155)、281VL4-CH1(118-130)-281 重鎖アミノ酸配列(配列番号156)はそれぞれ配列表に示す。

[0201] [実施例25] 多価抗体の発現と精製

作製した発現ベクター遺伝子をQIAGEN Plasmid Maxi Kit(キアゲン社製)にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System(Invitrogen社製)を用いて浮遊性293細胞に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。実施例16の手順に従い、この培養上清から精製抗体を得た。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/mLを抗体の濃度は1.40 Optical densityとして算出した。

[0202] [実施例26] 抗体の生産性の測定

抗体の生産性として、各培養上清中の抗体含有量を測定した。抗体含有量の測定は、実施例17の手順に従い行った。その結果を表7に示す。

[表7]

各抗体の生産性

多価抗体の名前	培養上清中の抗体濃度		リンカーアミノ酸数
	$\mu\text{g/mL}$	nM	
281	11.4	78.6	—
281VL4	14.5	99.5	—
281VL4-CH1-281	24.3	101.5	100
281VL4-CH1(118-131)-281	24.8	111.9	14
281VL4-CH1(118-130)-281	12.9	58.3	13

## [0203] [実施例27] 抗体の安定性の評価

抗体溶液の凝集体含有率は、実施例18の手順に従い測定した。その結果を表8に示す。

[表8]

各精製抗体の凝集体含有量

多価抗体の名前	凝集体含有量(%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-CH1-281	1.5	100
281VL4-CH1(118-131)-281	1.4	14
281VL4-CH1(118-130)-281	9.2	13

## [0204] [実施例28] 抗体の抗原結合性の評価

作製した2つ(CD40及びCD28)の認識部位を有する抗体の各抗原への結合を実施例19の手順に従い確認した。その結果、281VL4-CH1-281、281VL4-CH1(118-131)-281、281VL4-CH1(118-130)-281共にヒトCD40-Fc融合タンパク質及び、ヒトCD28-Fc融合タンパク質に結合することが確認された。

## [0205] [実施例29] CD28に対する抗原認識部位(281VL4由来)をN末側にCD40に対する抗原認識部位(281由来)をC末側に有し、表9のリンカーを含む多価抗体の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表9に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。この多価抗体を、281VL4-CH1(118-131)/C13

1S)-281と名づけた。

[表9]

多価抗体の Linker 構造

Linker		
名	アミノ酸配列	塩基配列
CH1 (118-131)	ASTKGPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1 (118-131/C131S)	ASTKGPSVFPLAPS	GCATCCCGACCAGCCCAAGGTCTTCCCCGCTGAGCCTCTCC

[0206] 281VL4-CH1 (118-131/C131S)-281は、重鎖の間 (281VL4の重鎖の3' 末端、281の重鎖の5' 末端) にはIgG1のCH1配列 (Kabat EUインデックス118番から131番) をリンカーとして挿入している。

[0207] これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。281VL4-CH1 (118-131/C131S)-281 重鎖核酸配列 (配列番号157)、281VL4-CH1 (118-131/C131S)-281 重鎖アミノ酸配列 (配列番号158) はそれぞれ配列表に示す。

[0208] [実施例30] CD28に対する抗原認識部位 (281VL4由来) をN末側にCD40に対する抗原認識部位 (281由来) をC末側に有し、表10のリンカーを含む多価抗体の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表10に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。これら多価抗体を、281VL4-CH1 (118-119+C)-281、281VL4-CH1 (118-120+C)-281、281VL4-CH1 (118-121+C)-281、281VL4-CH1 (118-122+C)-281、281VL4-CH1 (118-123+C)-281、281VL4-CH1 (118-124+C)-281、281VL4-CH1 (118-125+C)-281、281VL4-CH1 (118-126+C)-281、281VL4-CH1 (118-127+C)-281、281VL4-CH1 (118-128+C)-281、281VL4-CH1 (118-129+C)-281と名づけた。

[表10]

多価抗体の Linker 構造

Linker		
名	アミノ酸配列	塩基配列
CH1 (118-131)	ASTKGPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCTGGCGCCCTGC
CH1 (118-119+C)	ASC	GCTAGCTGC
CH1 (118-120+C)	ASTC	GCTAGCACCTGC
CH1 (118-121+C)	ASTKC	GCTAGCACCAAGTGC
CH1 (118-122+C)	ASTKGC	GCTAGCACCAAGGGGTGC
CH1 (118-123+C)	ASTKGPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATGC
CH1 (118-124+C)	ASTKGPSVC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCTGC
CH1 (118-125+C)	ASTKGPSVC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTGC
CH1 (118-126+C)	ASTKGPSVFC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCTGC
CH1 (118-127+C)	ASTKGPSVFC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCTGC
CH1 (118-128+C)	ASTKGPSVFPLC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCTGTGC
CH1 (118-129+C)	ASTKGPSVFPLAC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCTGGCGTGC

[0209] 281VL4-CH1 (118-119+C)-281、281VL4-CH1 (118-120+C)-281、281VL4-CH1 (118-121+C)-281、281VL4-CH1 (118-122+C)-281、281VL4-CH1 (118-123+C)-281、281VL4-CH1 (118-124+C)-281、281VL4-CH1 (118-125+C)-281、281VL4-CH1 (118-126+C)-281、281VL4-CH1 (118-127+C)-281、281VL4-CH1 (118-128+C)-281、281VL4-CH1 (118-129+C)-281は、重鎖の間 (281VL4の重鎖の3' 末端、281の重鎖の5' 末端) にはIgG4のCH1配列 (Kabat EUインデックス118番から119番 - 129番) とさらに、その3' 末端にTGC (アミノ酸に変換した場合システインをコードする核酸配列) を付加した配列をリンカーとして挿入している。

[0210] これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。それぞれの重鎖核酸配列、重鎖アミノ酸配列は配列表 (配列番号159-180) に示す。

[0211] [実施例31] CD28に対する抗原認識部位 (281VL4由来) をN末側にCD40に対する抗原認識部位 (281由来) をC末側に有し、表11のリンカーを含む多価抗体の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表11に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクタ

—は1種類の軽鎖配列を保持する。これら多価抗体を、281VL4-CH1(118-131/A118S)-281、281VL4-CH1(118-131/S119A)-281、281VL4-CH1(118-131/T120A)-281、281VL4-CH1(118-131/K121A)-281、281VL4-CH1(118-131/G122A)-281、281VL4-CH1(118-131/P123A)-281、281VL4-CH1(118-131/S124A)-281、281VL4-CH1(118-131/V125A)-281、281VL4-CH1(118-131/F126A)-281、281VL4-CH1(118-131/P127A)-281、281VL4-CH1(118-131/L128A)-281、281VL4-CH1(118-131/A129S)-281、281VL4-CH1(118-131/P130A)-281と名づけた。

[表11]

多価抗体の Linker 構造

名	Linker	
	アミノ酸配列	塩基配列
CH1(118-131)	ASTKGPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/A118S)	SSTKGPSVFPLAPC	TCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/S119A)	AATKGPSVFPLAPC	GCTGCCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/T120A)	ASARGPSVFPLAPC	GCTAGCGCCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/K121A)	ASTAGPSVFPLAPC	GCTAGCACCGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/G122A)	ASTKAPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/P123A)	ASTKGASVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/S124A)	ASTKGPAVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCAGCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/V125A)	ASTKGPSAFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/F126A)	ASTKGPSVAPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCCGCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/P127A)	ASTKGPSVFALAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCGCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/L128A)	ASTKGPSVFPAAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCGCGGCGCCCTGC
CH1(118-131/A129S)	ASTKGPSVFPLSPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGTCCGCCCCCTGC
CH1(118-131/P130A)	ASTKGPSVFPLAAC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC

[0212] 281VL4-CH1(118-131/A118S)-281、281VL4-CH1(118-131/S119A)-281、281VL4-CH1(118-131/T120A)-281、281VL4-CH1(118-131/K121A)-281、281VL4-CH1(118-131/G122A)-281、281VL4-CH1(118-131/P123A)-281、281VL4-CH1(118-131/S124A)-281、281VL4-CH1(118-131/V125A)-281、281VL4-G29H1(118-131/F126A)-281、281VL4-CH1(118-131/P127A)-281、281VL4-CH1(118-131/L128A)-281、281VL4-CH1(118-131/A129S)-281、281VL4-CH1(118-131/P130A)-281は、重鎖の間(281VL4の重鎖の3'末端、281の重鎖の5'末端)にはIgG4のCH1(Kabat EUインデックス118番から131番)に変異を加えた配列をリンカーとして挿入している。各々のリンカーに加えた変異は1アミノ酸ずつであり、IgG4のCH1配列のアミノ酸をアラニンに置換している。なお、本来の配列がアラニンの

箇所に変異を加える場合は、アラニンをシステインに置換している。

[0213] これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。それぞれの重鎖核酸配列、重鎖アミノ酸配列は配列表（配列番号181-206）に示す。

[0214] [実施例32] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、表12のリンカーを含む多価抗体の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表12に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。これら多価抗体を、281VL4-CH1 (IGHA)-281、281VL4-CH1 (IGHD (14))-281、281VL4-CH1 (IGHD (15))-281、281VL4-CH1 (IGHE)-281、281VL4-CH1 (IGHGP)-281、281VL4-CH1 (IGHM)-281と名づけた。

[表12]

多価抗体の Linker 構造

Linker		
名	アミノ酸配列	塩基配列
CH1 (118-131)	ASTKGPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1 (IGHA)	ASPTSPKVFPLSLC	GCATCCCGGACCAGCCCCAAGGTCTTCCCGCTGAGCCTCTGC
CH1 (IGHD (14))	APTKAPDVFPIISC	GCACCCACCAAGGCTCCGGATGTGTTCCCCATCATATCATGC
CH1 (IGHD (15))	APTKAPDVFPIISGC	GCACCCACCAAGGCTCCGGATGTGTTCCCCATCATATCAGGGTGC
CH1 (IGHE)	ASTQSPSVFPLTRC	GCCTCCACACAGAGCCCATCCGTCTTCCCCTTGACCCGCTGC
CH1 (IGHGP)	ASTKGPSVFPLVPC	GCCTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGTGCCTCTGC
CH1 (IGHM)	GSASAPTLFPLVSC	GGGAGTGCATCCGCCCCAACCCCTTTTCCCCCTCGTCTCTCTGT

[0215] 281VL4-CH1 (IGHA)-281、281VL4-CH1 (IGHD (14))-281、281VL4-CH1 (IGHE)-281、281VL4-CH1 (IGHGP)-281、281VL4-CH1 (IGHM)-281は、重鎖の間（281VL4の重鎖の3' 末端、281の重鎖の5' 末端）には各サブクラスのCH1配列（Kabat E Uインデックス118番から131番）をリンカーとして挿入している。131番目のアミノ酸がシステインではないサブクラスIGHDは131番のアミノ酸をグリシンからシステインに置換し、IGHGPは131番目のアミノ酸をセリンからシステインに置換している。なお、281VL4-CH1 (IGHD (15))-281は、重鎖の間にIGHDのC

H1配列（118番から132番）をリンカーとして挿入している。

[0216] これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。それぞれの重鎖核酸配列、重鎖アミノ酸配列は配列表（配列番号207-218）に示す。

[0217] [実施例33] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、表13のリンカーを含む多価抗体の発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表13に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、281と共通のものを抗CD28抗体も使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。これら多価抗体を、281VL4-CH1(118-131/A118G)-281、281VL4-CH1(118-131/S119T)-281、281VL4-CH1(118-131/P123F)-281、281VL4-CH1(118-131/V125L)-281、281VL4-CH1(118-131/V125I)-281、281VL4-CH1(118-131/F126L)-281、281VL4-CH1(118-131/F126Y)-281、281VL4-CH1(118-131/P127G)-281、281VL4-CH1(118-131/L128V)-281、281VL4-CH1(118-131/L128I)-281、281VL4-CH1(118-131/A129I)-281、281VL4-CH1(118-131/P130F)-281と名づけた。

[表13]

多価抗体の Linker 構造

Linker		
名	アミノ酸配列	塩基配列
CH1(118-131)	ASTKGPSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/A118G)	GSTKGPSVFPLAPC	GGCAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/S119T)	ATTKGPSVFPLAPC	GCTACCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/P123F)	ASTKGFSVFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGTTCTCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/V125L)	ASTKGPSLFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCCTGTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/V125I)	ASTKGPSIFPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCATCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/F126L)	ASTKGPSVLPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/F126Y)	ASTKGPSVYPLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTACCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/P127G)	ASTKGPSVFGLAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCGGCTTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/L128V)	ASTKGPSVFPVAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC
CH1(118-131/L128I)	ASTKGPSVFPIAPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCATCGCGCCCTGC
CH1(118-131/A129I)	ASTKGPSVFPLIPC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGATCCCTGC
CH1(118-131/P130F)	ASTKGPSVFPLAFC	GCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGTTCTGC

[0218] 281VL4-CH1(118-131/A118G)-281、281VL4-CH1(118-131/S119T)-281、281VL4-CH1(118-131/P123F)-281、281VL4-CH1(118-131/V125L)-281、281VL4-CH1(118-131/V125I)-281、281VL4-CH1(118-131/F126L)-281、281VL4-CH1(118-131/F126Y)-281、281VL4-CH1(118-131/P127G)-281、281VL4-CH1(118-131/L128V)-281、281VL4-CH1(118-131/L128I)-281、281VL4-CH1(118-131/A129I)-281、281VL4-CH1(118-131/P130F)-281は、重鎖の間(281VL4の重鎖の3'末端、281の重鎖の5'末端)にはIgG4のCH1(Kabat EUインデックス118番から131番)に変異を加えた配列をリンカーとして挿入している。各々のリンカーに加えた変異は1アミノ酸ずつであり、IgG4のCH1配列のアミノ酸をランダムに他のアミノ酸に置換している。

[0219] これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。それぞれの重鎖核酸配列、重鎖アミノ酸配列は配列表(配列番号219-242)に示す。

[0220] [実施例34] 多価抗体の発現と精製

実施例29~33で作製した発現ベクター遺伝子をQIAGEN Plasmid Maxi Kit(キアゲン社製)にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System(Invitrogen社製)を用いて浮遊性293細胞に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。実施例16の手順に従い、この培養上清から精製抗体を得た。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/mLを抗体の濃度は1.40 optical densityとして算出した。

[0221] [実施例35] 抗体の安定性の評価

抗体溶液の凝集体含有率は、実施例18の手順に従い測定した。その結果を表14に示す。

[表14]

各精製抗体の凝集体含有量

1) 実施例 29 で示した抗体

多価抗体の名前	凝集体含有量(%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-CH1 (118-131/C131S)-281	6.1	14

2) 実施例 30 で示した抗体

多価抗体の名前	凝集体含有量(%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-CH1 (118-119+C)-281	12.9	3
281VL4-CH1 (118-120+C)-281	13.3	4
281VL4-CH1 (118-121+C)-281	11.1	5
281VL4-CH1 (118-122+C)-281	13.0	6
281VL4-CH1 (118-123+C)-281	13.1	7
281VL4-CH1 (118-124+C)-281	11.2	8
281VL4-CH1 (118-125+C)-281	9.7	9
281VL4-CH1 (118-126+C)-281	12.2	10
281VL4-CH1 (118-127+C)-281	10.5	11
281VL4-CH1 (118-128+C)-281	9.7	12
281VL4-CH1 (118-129+C)-281	9.2	13

3) 実施例 31 で示した抗体

多価抗体の名前	凝集体含有量(%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-CH1 (118-131/A118S)-281	3.7	14
281VL4-CH1 (118-131/S119A)-281	3.6	14
281VL4-CH1 (118-131/T120A)-281	4.9	14
281VL4-CH1 (118-131/K121A)-281	3.3	14
281VL4-CH1 (118-131/G122A)-281	4.7	14
281VL4-CH1 (118-131/P123A)-281	2.9	14
281VL4-CH1 (118-131/S124A)-281	4.7	14
281VL4-CH1 (118-131/V125A)-281	3.4	14
281VL4-CH1 (118-131/F126A)-281	4.9	14
281VL4-CH1 (118-131/P127A)-281	5.3	14
281VL4-CH1 (118-131/L128A)-281	5.2	14
281VL4-CH1 (118-131/A129S)-281	4.3	14
281VL4-CH1 (118-131/P130A)-281	4.3	14

4) 実施例 32 で示した抗体

多価抗体の名前	凝集体含有量(%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-CH1 (IGHA)-281	2.6	14
281VL4-CH1 (IGHD(14))-281	3.9	14
281VL4-CH1 (IGHD(15))-281	3.9	15
281VL4-CH1 (IGHE)-281	3.6	14
281VL4-CH1 (IGHGP)-281	3.3	14
281VL4-CH1 (IGHM)-281	2.4	14

## [0222] 5) 実施例 33 で示した抗体

多価抗体の名前	凝集体含有量(%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-CH1(118-131/A118G)-281	3.2	14
281VL4-CH1(118-131/S119T)-281	2.7	14
281VL4-CH1(118-131/P123F)-281	3.5	14
281VL4-CH1(118-131/V125L)-281	2.6	14
281VL4-CH1(118-131/V125I)-281	2.1	14
281VL4-CH1(118-131/F126L)-281	3.6	14
281VL4-CH1(118-131/F126Y)-281	1.7	14
281VL4-CH1(118-131/P127G)-281	2.7	14
281VL4-CH1(118-131/L128V)-281	2.3	14
281VL4-CH1(118-131/L128I)-281	2.7	14
281VL4-CH1(118-131/A129I)-281	1.6	14
281VL4-CH1(118-131/P130F)-281	4.2	14

[0223] [実施例36] CD28に対する抗原認識部位(281VL4由来)をN末側にCD40に対する抗原認識部位(281由来)をC末側に有し、ヒトIg各サブクラスCH1領域内配列をリンカーとして用いた多価抗体の構造

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表1に示したリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。実施例における多価抗体のリンカーとしては、ヒトIg各サブクラスのCH1領域内配列と、その3'末端にBamHI配列であるGS(GGATCG)を加えたリンカーが挿入されている。これら多価抗体をそれぞれ

281VL4-A1(118~143)GS-281、281VL4-A2(118~143)GS-281、281VL4-E(118~143)GS-281、

281VL4-G1(118~143)GS-281、281VL4-G2(118~143)GS-281、281VL4-G3(118~143)GS-281、

281VL4-HGP(118~143)GS-281、281VL4-D(118~143)GS-281、281VL4-M(118~143)GS-281

と名付けた。

表15に、作製した多価抗体の構造をまとめた。

[表15]

## 多価抗体の構造

多価抗体の 名前	N 末側に 使用した 抗体名	C 末側に 使用した 抗体名	リンカーの塩基配列 (配列番号)	Kabat EU インデッ クス	リンカー アミノ酸 数
			リンカーのアミノ酸配列 (配列番号)		
281VL4-A1 (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 243) GCTAGCCCCACCAGCCCCAAGGTCT TCCCGCTGAGCCTCTGCAGACCCA GCCAGATGGGAACGTGGTCATCGCCGGATCC (配列番号 244) ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIAGS	118~143	27
281VL4-A2 (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 245) GCTAGCCCCACCAGCCCCAAGGTCT TCCCGCTGAGCCTCTGCAGACCC CCCAAGATGGGAACGTGGTCGTCGAGGATC C (配列番号 246) ASPTSPKVFPLSLCSTPQDGNVVVAGS	118~143	27
281VL4-D (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 247) GCACCCACCAAGGCTCCGGATGTGTT CCCCATCATATCAGGGTGCAGACACC CAAAGGATAACAGCCCTGTGGTCTGCCAGG ATCC (配列番号 248) APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLAGS	118~143	29
281VL4-E (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 249) GCTAGCACACAGAGCCCATCCGTCT TCCCCTTGACCCGCTGCTGCAAAAA CATTCCCTCCAATGCCACCTCCGTGACTCTG GGCGGATCC (配列番号 250) ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGGS	118~143	30
281VL4-G1 (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 251) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCTGGCACCTGCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCGGA TCC (配列番号 252) ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGGS	118~143	28
281VL4-G2 (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 253) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCGGA TCC (配列番号 254) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGGS	118~143	28

281VL4-G3 (118~143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 255) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCGCCTGCTCCAGGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCGGA TCC	118~143	28
			(配列番号 256) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGGS		
281VL4-HGP (118~143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 257) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGTGCCTGCTCCAGGAG CGTCTCTGAGGGCAGCGGCCCTGGGCGGA TCC	118~143	28
			(配列番号 258) ASTKGPSVFPLVPCRSVSEGTAALGGS		
281VL4-M (118~143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 259) GGGAGTGCATCCGCCCAACCCTTTTC CCCCTCGTCTCCTGTGAGAATCCCCG TCGATACGAGCAGCGTGGCCGTTGGCGGAT CC	118~143	29
			(配列番号 260) GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGGS		

[0225] [実施例37] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、配列番号244, 246, 250, 252, 254, 256, 258のリンカーを含む多価抗体発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、リンカー（配列番号244, 246, 250, 252, 254, 256, 258）を介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、抗281抗体、抗CD28抗体共に共通の軽鎖を使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。

[0226] これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。

[0227] 281VL4-A1(118~143)GS-281 重鎖核酸配列（配列番号261）、  
 281VL4-A1(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列（配列番号262）、  
 281VL4-A2(118~143)GS-281 重鎖核酸配列（配列番号263）、  
 281VL4-A2(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列（配列番号264）、  
 281VL4-E(118~143)GS-281 重鎖核酸配列（配列番号265）、  
 281VL4-E(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列（配列番号266）、

281VL4-G1(118~143)GS-281 重鎖核酸配列 (配列番号267)、  
 281VL4-G1(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列 (配列番号268)、  
 281VL4-G2(118~143)GS-281 重鎖核酸配列 (配列番号269)、  
 281VL4-G2(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列 (配列番号270)、  
 281VL4-G3(118~143)GS-281 重鎖核酸配列 (配列番号271)、  
 281VL4-G3(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列 (配列番号272)、  
 281VL4-HGP(118~143)GS-281 重鎖核酸配列 (配列番号273)、  
 281VL4-HGP(118~143)GS-281 重鎖アミノ酸配列 (配列番号274) はそれぞれ  
 配列表に示す。

[0228] [実施例38] CD28に対する抗原認識部位 (281VL4由来) をN末側にCD40に対  
 する抗原認識部位 (281由来) をC末側に有し、配列番号248、260のリンカー  
 を含む多価抗体発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価  
 抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、  
 リンカー (配列番号248、260) を介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタン  
 デムに結合した。軽鎖は、抗281抗体、抗CD28抗体共に共通の軽鎖を使用する  
 ため、発現ベクターは1種類の軽鎖配列を保持する。

[0229] 281VL4-リンカー(配列番号248、260)-281 の重鎖をコードする遺伝子配列  
 は以下の手順で作製した。

[0230] 281重鎖配列を鋳型とし、L primerとしてNheI CD40 Hc L 5' -CTAGCTAGCTG  
 AGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGGGGTGG-3' (配列番号275) を、U primer  
 としてIgD-CH1-CD40 U 5' -GCCCTGTGGTCTCTGGCaggatccCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG  
 GGCCC-3' (配列番号276) IgM-CH1-CD40 U 5' -ACGAGCAGCGTGGCCGTTGGCggatc  
 cCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG-3' (配列番号277) を用いて、DNAポリメラーゼ(KO  
 D-Plus, 東洋紡社製)により、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイ  
 クル実施した。更にこのPCR productを鋳型としL primerとしてNheI CD40 Hc  
 L 5' -CTAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGGGGTGG-3' (配列番  
 号275) を、U primerとしてIgD CH1-2U 5' -CATATCAGGGTGCAGACACCCAAAGGATA

ACAGCCCTGTGGTCCTGGCA-3' (配列番号278) IgM-CH1-2 U 5' -CTCGTCTCCTGTGA  
GAATTCCCCGTGGGATACGAGCAGCGTGGCCGTTG -3' (配列番号279) を用い、DNAポ  
リメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)により、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒  
の反応を30サイクル実施した。更にこのPCR productを鋳型としL primerとし  
てNheI CD40 Hc L 5' -CTAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGGGGTG  
G-3' (配列番号275) を、U primerとしてIgD CH1 U 5' -GCACCCACCAAGGCTCC  
GGATGTGTTCCCATCATATCAGGGTGCAGAC -3' (配列番号280) IgM CH1 U 5' -GGG  
AGTGCATCGGCCCAACCCCTTTTCCCCTCGTCTCCTGTGAGAATT -3' (配列番号281) を  
用い、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)により、95°C30秒、55°C30秒  
、68°C30秒の反応を30サイクル実施することにより、3' 末端にNheI配列を有  
する、リンカー - 281重鎖-NheIの遺伝子断片を作製した。一方、281VL4重鎖  
配列を鋳型とし、U primerとして5' -GGGGTCGACACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCT  
CCTGCTGGTGGCGG-3' (配列番号138)  
、L primerとしてCD28-IgD L 5' -CATCCGGAGCCTTGGTGGGTGCTGAGGAGACGGTGAC  
CATTGTCCCTTG-3' (配列番号282)、CD28-IgM L 5' -GGGTTGGGGCGGATGCACTC  
CCTGAGGAGACGGTGACCATTGTCCCTTG-3' (配列番号283) を用い、DNAポリメ  
ラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)により、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応  
を30サイクル実施し、5' 末端にSalI配列を有する、SalI- 281VL4-リンカー  
の遺伝子断片を作製した。SalI- 281VL4-リンカーの遺伝子断片とリンカー -  
281重鎖-NheIの遺伝子断片を、Over Extension PCRによって連結し、5' -GG  
GGTCGACACCATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGG-3' (配列番号138) とN  
heI CD40 Hc L 5' -CTAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCCAGGGGTGG-3  
' (配列番号275) を用い、DNAポリメラーゼ(KOD-Plus, 東洋紡社製)により  
、95°C30秒、55°C30秒、68°C30秒の反応を30サイクル実施することにより、5  
' 末端にSalI配列を、3' 末端にNheI配列を有する、SalI- 281VL4-リンカー-  
281-NheIの遺伝子断片を作製した。この遺伝子断片をSalI及びNheIで消化し  
、SalI及びNheIで開裂した281VL4発現ベクターに挿入した。281VL4-D(118~1  
44)GS-281重鎖核酸配列(配列番号284)、281VL4-D(118~143)GS-281重鎖ア

ミノ酸配列（配列番号285）、281VL4-M(118~143)GS-281重鎖核酸配列（配列番号286）、281VL4-M(118~143)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号287）はそれぞれ配列表に示す。

[0231] [実施例39] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、配列番号244~260のリンカーを含む多価抗体の発現と精製

作製した発現ベクター遺伝子をQIAGEN Plasmid Maxi Kit（キアゲン社製）にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System（Invitrogen社製）を用いて浮遊性293細胞に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。実施例16の手順に従い、この培養上清から精製抗体を得た。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/mLを抗体の濃度は1.40 Optimal densityとして算出した。

[0232] [実施例40] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、配列番号244~260のリンカーを含む多価抗体の生産性の測定

抗体の生産性として、各培養上清中の抗体含有量を測定した。抗体含有量の測定は、実施例17の手順に従い行った。その結果を表16に示す。

[表16]

各抗体の生産性

多価抗体の名前	培養上清中の抗体濃度(ug/ml)	リンカーアミノ酸数
281VL4-A1(118~143)GS-281	30.43	27
281VL4-A2(118~143)GS-281	30.37	27
281VL4-D(118~143)GS-281	34.81	29
281VL4-E(118~143)GS-281	32.40	30
281VL4-G1(118~143)GS-281	29.31	28
281VL4-G2(118~143)GS-281	28.13	28
281VL4-G3(118~143)GS-281	29.77	28
281VL4-HGP(118~143)GS-281	26.45	28
281VL4-M(118~144)GS-281	42.21	29

[0233] [実施例41] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、配列番号244~260のリンカーを含む多価抗体の安定性の評価

抗体溶液の凝集体含有率は、実施例18の手順に従い測定した。その結果を表17に示す。

[表17]

各精製抗体の凝集体含有量

	凝集体含量 (%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-A1 (118~143)GS-281	2.477	27
281VL4-A2 (118~143)GS-281	2.831	27
281VL4-D (118~143)GS-281	2.562	29
281VL4-E (118~143)GS-281	2.565	30
281VL4-G1 (118~143)GS-281	1.566	28
281VL4-G2 (118~143)GS-281	2.352	28
281VL4-G3 (118~143)GS-281	2.207	28
281VL4-HGP (118~143)GS-281	3.542	28
281VL4-M (118~143)GS-281	3.416	29

[0234] [実施例42] CD28に対する抗原認識部位 (281VL4由来) をN末側にCD40に対する抗原認識部位 (281由来) をC末側に有し、IgG2CH1領域の配列 (配列番号254、289、291、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311) をリンカーとして用いた多価抗体の構造

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、表6に示したヒトIgG2のCH1配列 (Kabat EUインデックス118番から143番) からN末に向かって1アミノ酸ずつ欠損させ (Kabat EUインデックス118番から131番)、その3'末端にBamHI配列であるGS (GGATCC) を加えた配列番号254、289、291、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311のリンカーを介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。これら多価抗体をそれぞれ、

281VL4-G2 (118~143)GS-281、281VL4-G2 (118~142)GS-281、281VL4-G2 (118~141)GS-281、

281VL4-G2 (118~140)GS-281、281VL4-G2 (118~139)GS-281、281VL4-G2 (118~138)GS-281、

281VL4-G2 (118~137)GS-281、281VL4-G2 (118~136)GS-281、281VL4-G2 (118~135)GS-281、

281VL4-G2(118~134)GS-281、281VL4-G2(118~133)GS-281、281VL4-G2(118~132)GS-281、

281VL4-CH1(118-131)-281と名付けた。なお、281VL4-G2(118~143)GS-281は実施例36に示した。また、Kabat EUインデックス118番から131番をリンカーとしたものは、実施例24に示した281VL4-CH1(118-131)-281を用いた。

[0235] 表18に、作製した多価抗体の構造をまとめた。

[表18]

## 多価抗体の構造

多価抗体の 名前	N 末側に 使用した 抗体名	C 末側に 使用した 抗体名	リンカーの塩基配列 (配列番号)	Kabat EU インデッ クス	リンカー アミノ酸 数
			リンカーのアミノ酸配列 (配列番号)		
281VL4-G2 (118~ 143)GS-281	281VL4	281	(配列番号 253) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCGCCTGCTCCAGGAG CACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCGGA TCC	118~143	28
			(配列番号 254) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGGS		
281VL4-G2 (118~ 142)GS-281	281VL4	281	(配列番号 288) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGATCC	118~142	27
			(配列番号 289) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGS		
281VL4-G2 (118~ 141)GS-281	281VL4	281	(配列番号 290) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCGATCC	118~141	26
			(配列番号 291) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAGS		
281VL4-G2 (118~ 140)GS-281	281VL4	281	(配列番号 292) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCCGGATCC	118~140	25
			(配列番号 293) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAGS		
281VL4-G2 (118~ 139)GS-281	281VL4	281	(配列番号 294) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGGATCC	118~139	24
			(配列番号 295) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTGS		
281VL4-G2 (118~ 138)GS-281	281VL4	281	(配列番号 296) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCGGATCC	118~138	23
			(配列番号 297) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESGS		

[0236]

281VL4-G2 (118~ 137)GS-281	281VL4	281	(配列番号 298) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGGGATCC	118~137	22
			(配列番号 299) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEGS		
281VL4-G2 (118~ 136)GS-281	281VL4	281	(配列番号 300) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG GATCC	118~136	21
			(配列番号 301) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGS		
281VL4-G2 (118~ 135)GS-281	281VL4	281	(配列番号 302) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCGGATCC	118~135	20
			(配列番号 303) ASTKGPSVFPLAPCSRSTGS		
281VL4-G2 (118~ 134)GS-281	281VL4	281	(配列番号 304) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCGGATCC	118~134	19
			(配列番号 305) ASTKGPSVFPLAPCSRSGS		
281VL4-G2 (118~ 133)GS-281	281VL4	281	(配列番号 306) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGGGATCC	118~133	18
			(配列番号 307) ASTKGPSVFPLAPCSRGS		
281VL4-G2 (118~ 132)GS-281	281VL4	281	(配列番号 308) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCGGATCC	118~132	17
			(配列番号 309) ASTKGPSVFPLAPCSGS		
281VL4-CH1 (118-131)-2 81	281VL4	281	(配列番号 310) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGC	118~131	14
			(配列番号 311) ASTKGPSVFPLAPC		

[0237] [実施例43] CD28に対する抗原認識部位（281VL4由来）をN末側にCD40に対する抗原認識部位（281由来）をC末側に有し、配列番号289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309のリンカーを含む多価抗体発現ベクターの作製

重鎖N末側からCD28に対する認識部位とCD40に対する認識部位が並んだ多価抗体を作製するために、N末端側から、抗CD28抗体281VL4の重鎖可変領域を、リンカー（配列番号289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309）を介して抗CD40抗体281の重鎖可変領域にタンデムに結合した。軽鎖は、抗281抗体、抗CD28抗体共に共通の軽鎖を使用するため、発現ベクターは1種類の軽鎖

配列を保持する。これら抗体の重鎖をコードする遺伝子配列は実施例24で用いた遺伝学的手法の手順を参考にして作製した。

- [0238] 281VL4-G2(118~142)GS-281重鎖核酸配列（配列番号312）、  
281VL4-G2(118~142)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号313）、  
281VL4-G2(118~141)GS-281重鎖核酸配列（配列番号314）、  
281VL4-G2(118~141)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号315）、  
281VL4-G2(118~140)GS-281重鎖核酸配列（配列番号316）、  
281VL4-G2(118~140)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号317）、  
281VL4-G2(118~139)GS-281重鎖核酸配列（配列番号318）、  
281VL4-G2(118~139)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号319）、  
281VL4-G2(118~138)GS-281重鎖核酸配列（配列番号320）、  
281VL4-G2(118~138)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号321）、  
281VL4-G2(118~137)GS-281重鎖核酸配列（配列番号322）、  
281VL4-G2(118~137)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号323）、  
281VL4-G2(118~136)GS-281重鎖核酸配列（配列番号324）、  
281VL4-G2(118~136)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号325）、  
281VL4-G2(118~135)GS-281重鎖核酸配列（配列番号326）、  
281VL4-G2(118~135)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号327）、  
281VL4-G2(118~134)GS-281重鎖核酸配列（配列番号328）、  
281VL4-G2(118~134)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号329）、  
281VL4-G2(118~133)GS-281重鎖核酸配列（配列番号330）、  
281VL4-G2(118~133)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号331）、  
281VL4-G2(118~132)GS-281重鎖核酸配列（配列番号332）、  
281VL4-G2(118~132)GS-281重鎖アミノ酸配列（配列番号333）はそれぞれ配列表に示す。

[0239] [実施例44] 多価抗体の発現と精製

作製した発現ベクター遺伝子をQIAGEN Plasmid Maxi Kit（キアゲン社製）にて調製し、FreeStyle™ 293 Expression System（Invitrogen社製）を用い

て浮遊性293細胞に導入して、一過性発現により各抗体を含む培養上清を得た。実施例16の手順に従い、この培養上清から精製抗体を得た。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1mg/mLを抗体の濃度は1.40 Optical densityとして算出した。

[0240] [実施例45] 抗体の生産性の測定

抗体の生産性として、各培養上清中の抗体含有量を測定した。抗体含有量の測定は、実施例17の手順に従い行った。その結果を表19に示す。

[表19]

各抗体の生産性

多価抗体の名前	培養上清中の抗体濃度 (ug/ml)	リンカーアミノ酸数
281VL4-G2 (118~143)GS-281	30.70	28
281VL4-G2 (118~142)GS-281	33.68	27
281VL4-G2 (118~141)GS-281	35.77	26
281VL4-G2 (118~140)GS-281	35.95	25
281VL4-G2 (118~139)GS-281	33.31	24
281VL4-G2 (118~138)GS-281	32.72	23
281VL4-G2 (118~137)GS-281	31.69	22
281VL4-G2 (118~136)GS-281	1.28	21
281VL4-G2 (118~135)GS-281	28.09	20
281VL4-G2 (118~134)GS-281	0.44	19
281VL4-G2 (118~133)GS-281	1.46	18
281VL4-G2 (118~132)GS-281	34.78	17
281VL4-CHI (118-131)-281	35.91	14

[0241] [実施例46] 抗体の安定性の評価

抗体溶液の凝集体含有率は、実施例18の手順に従い測定した。その結果を表20に示す。

[表20]

各精製抗体の凝集体含有量

	凝集体含量 (%)	リンカーアミノ酸数
281VL4-G2 (118~143) GS-281	1.865	27
281VL4-G2 (118~142) GS-281	1.875	26
281VL4-G2 (118~141) GS-281	1.907	25
281VL4-G2 (118~140) GS-281	1.921	24
281VL4-G2 (118~139) GS-281	1.786	23
281VL4-G2 (118~138) GS-281	1.619	22
281VL4-G2 (118~137) GS-281	1.546	21
281VL4-G2 (118~136) GS-281	-	20
281VL4-G2 (118~135) GS-281	1.254	19
281VL4-G2 (118~134) GS-281	-	18
281VL4-G2 (118~133) GS-281	-	17
281VL4-G2 (118~132) GS-281	1.522	16
281VL4-CH1 (118-131)-281	1.246	14

### 産業上の利用可能性

[0242] 本発明の抗体は、安定性が高い上に、生産性よく作製可能であるという特徴を有しており、医薬や診断用の抗体としての利用性を有している。

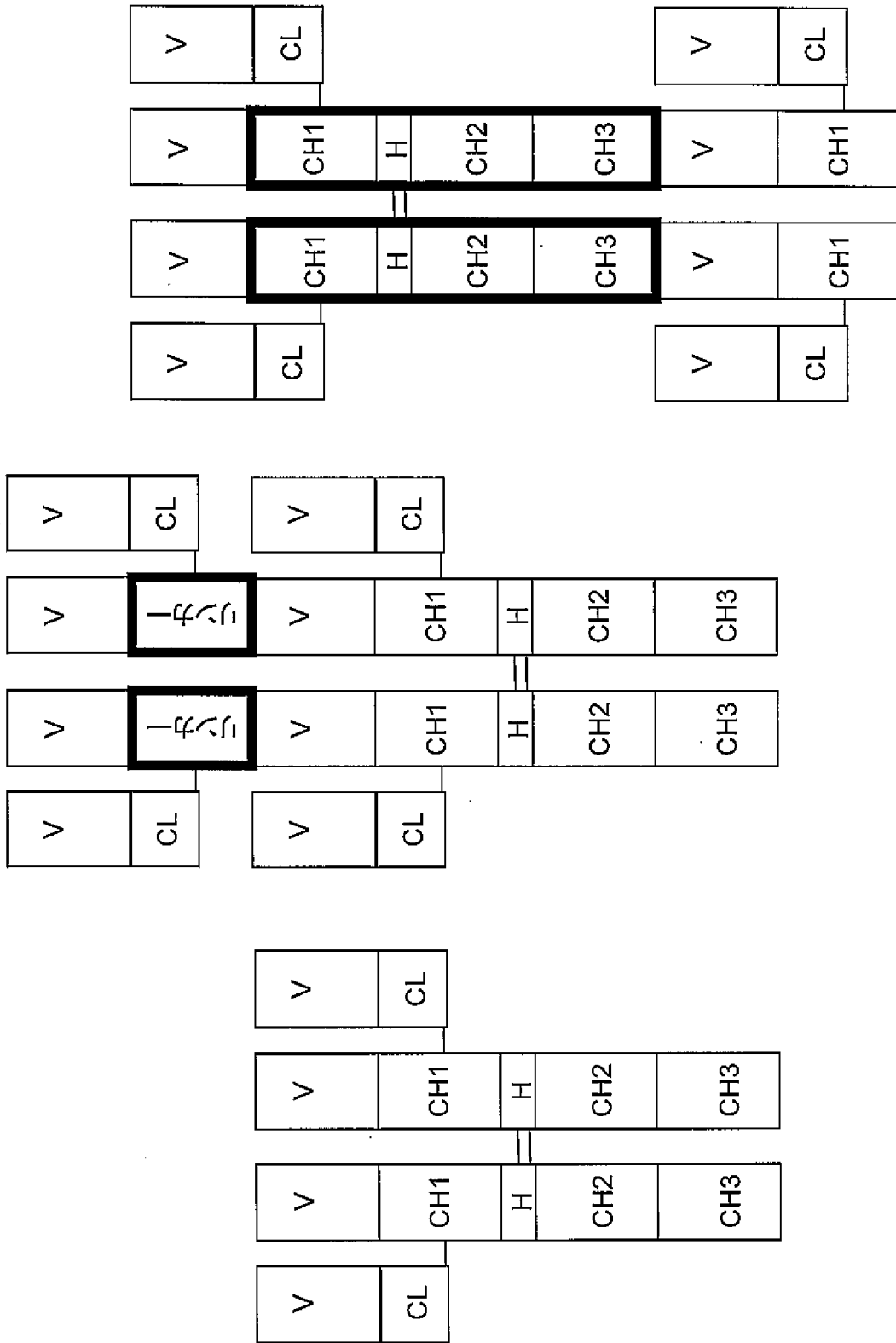
[0243] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

- [請求項1] 複数の抗体重鎖可変領域がイムノグロブリンドメインまたはその断片のアミノ酸配列を有するリンカーを介して結合していることを特徴とする多価抗体。
- [請求項2] イムノグロブリンドメインが、CH1、ヒンジ、CH2、および/またはCH3からなるイムノグロブリンドメインである、請求項1記載の多価抗体。
- [請求項3] イムノグロブリンドメインが、CH1またはCH1断片である、請求項2記載の多価抗体。
- [請求項4] CH1断片が、14番目がシステイン（Cys）である14アミノ酸からなるCH1断片である、請求項3記載の多価抗体。
- [請求項5] CH1断片が、IgD、IgM、IgG、IgAおよびIgEの抗体サブクラスから選ばれるCH1のアミノ酸配列のN末端から1番目～14番目のアミノ酸配列である、請求項4記載の多価抗体。
- [請求項6] CH1断片のアミノ酸配列が、配列番号311および配列番号334～配列番号361から選ばれるいずれか1つのアミノ酸配列である、請求項5記載の多価抗体。
- [請求項7] CH1断片のアミノ酸配列が、配列番号362～配列番号375から選ばれるいずれか1つのアミノ酸配列である、請求項3記載の多価抗体。
- [請求項8] 同一の軽鎖を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の多価抗体。
- [請求項9] 請求項1～8のいずれか1項に記載の多価抗体のアミノ酸配列をコードするDNA。
- [請求項10] 請求項9記載のDNAを含む組換えベクター。
- [請求項11] 請求項10に記載の組換えベクターが導入された形質転換体。
- [請求項12] 請求項11に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1～8のいずれか1項に記載の多価抗体を生成蓄積させ、培養物から該抗体または該抗体断片を採取することを特徴とする、請求項1～8の

いずれか 1 項に記載の多価抗体の製造方法。

[図1]



リンカーとしてCH1、ヒンジ、CH2、CH3を使用した多価抗体

リンカーを  
使用した多価抗体

IgG抗体

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/058249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/00, C07K16/28 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI, BIOSIS(STN), CPlus(STN), MEDLINE(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2003-531588 A (Genentech, Inc.), 28 October, 2003 (28.10.03), & US 2002/0004587 A1 & EP 1272647 A & WO 2001/077342 A1 & AU 4761601 A & BR 110610 A & CA 2403425 A & HU 300369 A & IL 151853 D & NZ 521540 A & CN 1464908 A	1-12/4-12
X/Y	US 2007/0071675 A1 (Wu C.), 29 March, 2007 (29.03.07), & EP 2056869 A & WO 2008/024188 A2	1-12/4-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 July, 2009 (30.07.09)		Date of mailing of the international search report 11 August, 2009 (11.08.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/058249

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2007/024715 A1 (Abbot Laboratories), 01 March, 2007 (01.03.07), & JP 2009-504191 A & US 2007/0041905 A1 & EP 1928506 A & CA 2618482 A & NO 20081354 A & KR 10-2008-0040720 A & CN 101370525 A	1-12/4-12
X/Y	Wu C. et al., Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable- domain immunoglobulin., Nature Biotechnology, 2007, 25(11), p.1290-1297	1-12/4-12
A	Morrison S., Two heads are better than one., Nature Biotechnology, 2007, 25(11), p.1233-1234	1-12

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/46(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12P21/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)n</p>												
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/46, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/09, C12P21/00, C07K16/28</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2009年											
日本国実用新案登録公報	1996-2009年											
日本国登録実用新案公報	1994-2009年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI, BIOSIS(STN), CPlus(STN), MEDLINE(STN)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X/ Y</td> <td>JP 2003-531588 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.10.28, &amp; US 2002/0004587 A1 &amp; EP 1272647 A &amp; WO 2001/077342 A1 &amp; AU 4761601 A &amp; BR 110610 A &amp; CA 2403425 A &amp; HU 300369 A &amp; IL 151853 D &amp; NZ 521540 A &amp; CN 1464908 A</td> <td>1-12/ 4-12</td> </tr> <tr> <td>X/ Y</td> <td>US 2007/0071675 A1 (Wu C.) 2007.03.29, &amp; EP 2056869 A &amp; WO 2008/024188 A2</td> <td>1-12/ 4-12</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X/ Y	JP 2003-531588 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.10.28, & US 2002/0004587 A1 & EP 1272647 A & WO 2001/077342 A1 & AU 4761601 A & BR 110610 A & CA 2403425 A & HU 300369 A & IL 151853 D & NZ 521540 A & CN 1464908 A	1-12/ 4-12	X/ Y	US 2007/0071675 A1 (Wu C.) 2007.03.29, & EP 2056869 A & WO 2008/024188 A2	1-12/ 4-12	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X/ Y	JP 2003-531588 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.10.28, & US 2002/0004587 A1 & EP 1272647 A & WO 2001/077342 A1 & AU 4761601 A & BR 110610 A & CA 2403425 A & HU 300369 A & IL 151853 D & NZ 521540 A & CN 1464908 A	1-12/ 4-12										
X/ Y	US 2007/0071675 A1 (Wu C.) 2007.03.29, & EP 2056869 A & WO 2008/024188 A2	1-12/ 4-12										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日</p> <p>30.07.2009</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>11.08.2009</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)</p> <p>郵便番号100-8915</p> <p>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>滝口 尚良</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<table border="1"> <tr> <td>4N</td> <td>3846</td> </tr> </table>	4N	3846								
4N	3846											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	WO 2007/024715 A1 (アボット・ラボラトリーズ) 2007.03.01, & JP 2009-504191 A & US 2007/0041905 A1 & EP 1928506 A & CA 2618482 A & NO 20081354 A & KR 10-2008-0040720 A & CN 101370525 A	1-12/ 4-12
X/ Y	Wu C. et al., Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin., Nature Biotechnology, 2007, 25(11), p.1290-1297	1-12/ 4-12
A	Morrison S., Two heads are better than one., Nature Biotechnology, 2007, 25(11), p.1233-1234	1-12